

**DIE WIRKSAMKEIT EINER IMMUNISIERUNG  
MIT VACCINIA-VIRUS STAMM "MVA" GEGEN EINE  
INFEKTION MIT KUHPOCKEN-VIRUS STAMM "OPV 85"  
BEIM KANINCHEN.  
EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN UND EINE  
LITERATURSTUDIE ÜBER  
KUHPOCKENVIRUSINFEKTIONEN BEI MENSCH UND  
TIER.**

Susanne Linckh

Disbui. München

1988







Aus dem Institut für Vergleichende Tropenmedizin  
und Parasitologie der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. R. Gothe  
Angefertigt unter der Leitung von Prof. Dr. E. Munz

**DIE WIRKSAMKEIT EINER IMMUNISIERUNG  
MIT VACCINIA-VIRUS STAMM "MVA" GEGEN EINE  
INFEKTION MIT KUHPOCKEN-VIRUS STAMM "OPV 85"  
BEIM KANINCHEN.  
EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN UND EINE  
LITERATURSTUDIE ÜBER  
KUHPOCKENVIRUSINFEKTIONEN BEI MENSCH UND  
TIER.**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von  
Susanne Linckh  
aus  
München

München 1988

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. M. Rüsse  
Referent: Prof. Dr. E. Munz  
Korreferent: Prof. Dr. H. Mahnel

Tag der Promotion: 29. Juli 1988

Für meine Eltern



## Inhaltsverzeichnis

|              |                                                                                                                                                 |    |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.           | <b><u>Einleitung</u></b>                                                                                                                        | 1  |
| 2.           | <b><u>Allgemeiner Überblick über Infektionen mit originären Kuhpockenviren, kuhpocken-virusähnlichen Erregern und Elefanten-pockenviren</u></b> | 3  |
| 2.1          | Definitionen                                                                                                                                    | 3  |
| 2.2          | Geschichte und Vorkommen                                                                                                                        | 5  |
| 2.3          | <b><u>Die Erreger</u></b>                                                                                                                       | 8  |
| 2.3.1.       | Klassifizierung                                                                                                                                 | 8  |
| 2.3.2.       | Morphologie                                                                                                                                     | 11 |
| 2.3.3        | Biologische Eigenschaften                                                                                                                       | 12 |
| 2.3.3.1.     | Züchtung im bebrüteten Hühnerei                                                                                                                 | 12 |
| 2.3.3.2.     | Züchtung in Zellkulturen                                                                                                                        | 16 |
| 2.3.3.3.     | Züchtung im Versuchstier                                                                                                                        | 19 |
| 2.3.3.3.1.   | Rind                                                                                                                                            | 19 |
| 2.3.3.3.2.   | Nagetiere                                                                                                                                       | 20 |
| 2.3.3.3.2.1. | Maus                                                                                                                                            | 20 |
| 2.3.3.3.2.2. | Ratte                                                                                                                                           | 23 |
| 2.3.3.3.2.3. | Rennmaus und Gelbziegel                                                                                                                         | 24 |
| 2.3.3.3.3.   | Kaninchen                                                                                                                                       | 24 |
| 2.3.3.3.4.   | Hauskatze                                                                                                                                       | 28 |
| 2.3.3.3.5.   | Huhn                                                                                                                                            | 28 |
| 2.3.4.       | Physikalisch-chemische Eigenschaften                                                                                                            | 30 |
| 2.3.5.       | Antigenverwandtschaft                                                                                                                           | 31 |
| 2.3.6.       | Einschlußkörperchen                                                                                                                             | 38 |
| 2.4.         | <b><u>Die Krankheiten</u></b>                                                                                                                   | 41 |
| 2.4.1.       | Epizootiologie                                                                                                                                  | 41 |
| 2.4.2.       | Klinik und Pathologie                                                                                                                           | 45 |
| 2.4.2.1.     | Rind                                                                                                                                            | 46 |
| 2.4.2.2.     | Nagetiere                                                                                                                                       | 47 |
| 2.4.2.3.     | Okapi                                                                                                                                           | 48 |

|          |                                                           |    |
|----------|-----------------------------------------------------------|----|
| 2.4.2.4. | Riesenameisenbär                                          | 48 |
| 2.4.2.5. | Raubkatzen                                                | 49 |
| 2.4.2.6. | Hauskatze                                                 | 50 |
| 2.4.2.7. | Elefant                                                   | 52 |
| 2.4.3.   | Immunität                                                 | 56 |
| 2.4.4.   | Diagnose                                                  | 58 |
| 2.4.5.   | Differentialdiagnose                                      | 59 |
| 2.4.6.   | Therapie und Prophylaxe                                   | 60 |
| 2.4.7.   | Kuh- und Elefantenpockenvirusinfektionen<br>beim Menschen | 61 |
| 2.4.8.   | Kuhpockenvirus "OPV 85"                                   | 63 |

### Eigene Untersuchungen

|        |                                                                    |    |
|--------|--------------------------------------------------------------------|----|
|        | Abkürzungen                                                        | 64 |
| 3.     | <b><u>Material und Methoden</u></b>                                | 64 |
| 3.1.   | Virusstämme                                                        | 64 |
| 3.1.1. | Impfstoff Vaccinia-Virus "MVA"                                     | 64 |
| 3.1.2. | Virusstamm für die Belastungsinfektion<br>Kuhpocken-Virus "OPV 85" | 64 |
| 3.2.   | Zellkulturen                                                       | 65 |
| 3.2.1. | Verozellen                                                         | 65 |
| 3.2.2. | Kaninchennierenzellen (RK 13-Zellen)                               | 65 |
| 3.2.3. | Hühnerembryofibroblasten                                           | 65 |
| 3.3.   | Virusvermehrung in der Zellkultur                                  | 65 |
| 3.4.   | Virustitration in Zellkulturen                                     | 66 |
| 3.5.   | Versuchstiere                                                      | 66 |
| 3.6.   | Durchführung der Impfungen mit<br>Vac-Virus "MVA"                  | 66 |
| 3.7.   | Untersuchungen über die Unschädlichkeit<br>des Impfstoffes         | 67 |
| 3.8.   | Untersuchungen über die Wirksamkeit<br>des Impfstoffes             | 67 |

|          |                                                                                                                                  |     |
|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.8.1.   | Durchführung der Belastungsinfektion mit KuP-Virus "OPV 85"                                                                      | 68  |
| 3.8.1.1. | Dosis der Belastungsinfektion                                                                                                    | 69  |
| 3.8.2.   | Serologische Untersuchungen                                                                                                      | 72  |
| 3.8.2.1. | Serumgewinnung                                                                                                                   | 72  |
| 3.8.2.2. | Hämagglutinationshemmungstest HAH-Test                                                                                           | 72  |
| 3.8.2.3. | Neutralisationstest N-Test                                                                                                       | 73  |
| 3.8.2.4. | Enzyme-Linked Immunosorbent Assay ELISA                                                                                          | 74  |
| 4.       | <b><u>Versuche und Ergebnisse</u></b>                                                                                            | 76  |
| 4.1.     | Belastungsinfektion mit KuP-Virus "OPV 85"                                                                                       | 76  |
| 4.1.1.   | Einstellung der Testdosis (Vorversuche)                                                                                          | 76  |
| 4.1.2.   | Unschädlichkeit einer Immunisierung mit Vac-Virus "MVA"                                                                          | 79  |
| 4.1.3.   | Wirksamkeit einer Immunisierung mit Vac-Virus "MVA" gegenüber einer Belastungsinfektion mit KuP-Virus OPV 85" (Hauptversuch)     | 79  |
| 4.1.3.1. | Klinisches Bild der Kontrollinfektion mit KuP-Virus "OPV 85"                                                                     | 80  |
| 4.1.3.2. | Klinisches Bild der Belastungsinfektion mit KuP-Virus "OPV 85" bei geimpften Tieren                                              | 86  |
| 4.1.3.3. | Bewertung des klinischen Bildes der Belastungsinfektion mit KuP-Virus "OPV 85" bei immunisierten Kaninchen                       | 86  |
| 4.1.3.4. | Wirksamkeit der Zahl der durchgeführten Impfungen mit Vac-Virus "MVA" gegenüber einer Belastungsinfektion mit KuP-Virus "OPV 85" | 98  |
| 4.1.3.5. | Wirksamkeit der Applikationsart von Vac-Virus "MVA" gegenüber einer Belastungsinfektion mit KuP-Virus "OPV 85"                   | 105 |
| 4.1.3.6. | Wirksamkeit der Impfdosis von Vac-Virus "MVA" gegenüber einer Belastungsinfektion mit KuP-Virus "OPV 85"                         | 108 |

|          |                                                                                                                                                               |     |
|----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.2.     | Antikörperbildung nach Immunisierung mit Vac-Virus "MVA" und nach Belastungsinfektion mit KuP-Virus "OPV 85"                                                  | 113 |
| 4.2.1.   | Standardisierung des ELISA                                                                                                                                    | 113 |
| 4.2.2.   | Antikörperbildung nach Immunisierung mit Vac-Virus "MVA" und nach Belastungsinfektion mit KuP-Virus "OPV 85" bei immunisierten und nicht immunisierten Tieren | 120 |
| 4.2.2.1. | Zusammenhang zwischen der Zahl der Impfungen mit Vac-Virus "MVA" und der Antikörperbildung                                                                    | 120 |
| 4.2.2.2. | Zusammenhang zwischen der Applikationsart von Vac-Virus "MVA" und der Antikörperbildung                                                                       | 120 |
| 4.2.2.3. | Zusammenhang zwischen der Impfdosis von Vac-Virus "MVA" und der Antikörperbildung                                                                             | 121 |
| 4.2.2.4. | Ergebnisse von HAH-Test, N-Test und ELISA im Vergleich                                                                                                        | 122 |
| 4.2.2.5. | Antikörperbildung und Wiederimpfreaktionen nach Belastungsinfektion mit KuP-Virus "OPV 85" im Vergleich                                                       | 122 |
| 5.       | <u>Besprechung der Ergebnisse</u>                                                                                                                             | 124 |
| 6.       | <u>Zusammenfassung-Summary</u>                                                                                                                                | 135 |
| 7.       | <u>Literaturverzeichnis</u>                                                                                                                                   | 138 |

Lebenslauf

## Abkürzungen

|                   |                                                                                                                                             |
|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| AK                | Antikörper                                                                                                                                  |
| AntP-Virus        | Ameisenbärenpockenvirus                                                                                                                     |
| AP-Virus          | Affenpockenvirus                                                                                                                            |
| CAM               | Chorioallantoismembran                                                                                                                      |
| CarP-Virus        | Carnivorapockenvirus                                                                                                                        |
| CatP-Virus        | Katzenpockenvirus                                                                                                                           |
| cpE               | zytopathischer Effekt                                                                                                                       |
| DNS               | Desoxyribonukleinsäure                                                                                                                      |
| EK                | Einschlußkörper                                                                                                                             |
| Ek-Virus          | Ektromelievirus                                                                                                                             |
| ELISA             | Enzyme-Linked Immunosorbent Assay                                                                                                           |
| EP-Virus          | Elefantenpockenvirus                                                                                                                        |
| FKS               | fötales Kälberserum                                                                                                                         |
| GerP-Virus        | Gerbilpockenvirus                                                                                                                           |
| HA                | Hämagglutination                                                                                                                            |
| HAH               | Hämagglutinationshemmung                                                                                                                    |
| HEF               | Hühnerembryofibroblasten                                                                                                                    |
| i.cer.            | intrazerebral                                                                                                                               |
| i.d.              | intradermal                                                                                                                                 |
| i.k.              | intrakutan                                                                                                                                  |
| i.n.              | intranasal                                                                                                                                  |
| i.p.              | intraperitoneal                                                                                                                             |
| i.v.              | intravenös                                                                                                                                  |
| KD                | Kilodalton                                                                                                                                  |
| KID <sub>50</sub> | 50% kulturinfektiöse Dosis, d.h. die Virusdosis, die bei 50 % der infizierten Zellkulturen einen spezifischen zytopathischen Effekt erzeugt |
| KuP-Virus         | Kuhpockenvirus                                                                                                                              |
| kut.              | kutan                                                                                                                                       |
| M 199             | Medium 199                                                                                                                                  |
| MEM               | Minimal Essential Medium                                                                                                                    |
| MG                | Molekulargewicht                                                                                                                            |



|              |                                                                      |
|--------------|----------------------------------------------------------------------|
| MKA          | monoklonale Antikörper                                               |
| N            | Neutralisation                                                       |
| OkP-Virus    | Okapipockenvirus                                                     |
| p.inf.       | post infectionem                                                     |
| p.vacc.      | post vaccinationem                                                   |
| PBE          | pockenbildende Einheiten                                             |
| PBS          | Phosphat buffered saline, phosphatgepufferte<br>Natriumchloridlösung |
| RatP-Virus   | Rattenpockenvirus                                                    |
| RhiP-Virus   | Rhinozeruspockenvirus                                                |
| RK 13-Zellen | Rabbit Kidney Zellen, Kaninchenierenzellen                           |
| SDS-PAGE     | Sodium-Dodecylsulfat Polyacryl-<br>amidgel- Elektrophorese           |
| Vac-Virus    | Vaccinia-Virus                                                       |
| Var-Virus    | Variola-Virus                                                        |

## 1. Einleitung

Die weltweit durchgeführte Pockenimpfung hat zusammen mit sanitätsbehördlichen Maßnahmen dazu geführt, daß die Pocken des Menschen (Variola und Alastrim) ausgerottet sind. Dieser in der Geschichte der Seuchenbekämpfung einmalige Erfolg wurde durch eine Impfung mit Vaccinia-Virus erreicht, das neben einer Immunität gegen Variola und Alastrim auch einen Schutz gegen alle vom Tier auf den Menschen übertragbaren Pockenviren des Genus "Orthopoxvirus" vermittelt.

Diese Tierpockenviren sind weiterhin im Tierstapel verbreitet. Bisher kamen sie gelegentlich sporadisch, selten enzootisch vor. In letzter Zeit wurden nun neben neuen, bisher nicht identifizierbaren Tierpockenviren bei einigen längst bekannten Pockenviren Änderungen in ihrer Wirtsspezifität beobachtet. Ein gutes Beispiel dafür bietet das Kuhpocken-Virus, das sich im Verlauf vieler Jahre an andere Tierarten adaptiert hat, wobei seine Kontagiosität für den Menschen erhalten blieb.

Die vom Tier auf den Menschen übertragbaren Orthopockenviren führten beim Menschen in der Regel zu nicht kontagiösen, gutartigen, lokalen Pockenerkrankungen, selten lösten sie bei besonders disponierten Personen oder Kindern schwere Allgemeinerkrankungen aus.

Die Pockenschutzimpfung, mit erheblichen postvakzinalen Komplikationen belastet, wurde nach der Ausrottung der Pocken des Menschen in fast allen Ländern und im internationalen Reiseverkehr eingestellt, so daß der Impfschutz in der Bevölkerung jetzt langsam abnimmt. Noch besteht ein ausgeprägter Populationschutz, von dem auch ungeimpfte Personen profitieren. Es ist jedoch damit zu rechnen, daß nach Unterschreiten eines bestimmten Schwellenwertes der Mensch für tierische Orthopockenviren empfänglicher wird, die Erkrankungsfälle schwerer verlaufen, Infektionen leichter weitergegeben werden oder sich durch Serienpassagen noch verstärken.

Deshalb sollte eine freiwillige Schutzimpfung gefährdeter Personenkreise, aber auch von Säuglingen, Kindern und Erwachsenen generell ermöglicht werden. Zu

den gefährdeten Personen zählen praktizierende Tierärzte, das Personal von Medizinal-, Veterinäruntersuchungsämtern und Pockenalarmstationen, sowie Fachexperten und andere Personen (Mayr, 1985).

Da heute ein großer Teil der Impflinge bei einer Pockenimpfung als "überalterte Erstimpflinge" für postvakzinale Komplikationen prädisponiert wäre, und zudem immer mehr Personen immunsuppressiven Zuständen (z.B. bei Kortison- oder zytostatischer Therapie) unterworfen sind, sollten die früher gebrauchten virulenten Vaccinia-Virusstämme nicht mehr verwendet werden, auch nicht der von der WHO empfohlene und auf Vorrat gehaltene Stamm "Elstree".

Mittel der Wahl sind heute attenuierte, genetisch stabile, schwach oder avirulente Vaccinia-Virusstämme. Mit dem Stamm "MVA" steht ein unschädlicher Impfstoff mit geringer Virulenz und fehlender Kontagiosität zur Verfügung, der gefahrlos parenteral appliziert werden kann. Er ist bisher beim Menschen nur zur Vorimpfung gegen Variola und Alastrim zugelassen.

Aufgabe dieser Untersuchungen war es, die Wirksamkeit einer Immunisierung mit Vaccinia-Virus "MVA" gegenüber einer Infektion mit Kuhpocken-Virus "OPV 85" beim Kaninchen im Hinblick auf eine spätere Verwendung für eine Impfung gegen Kuhpocken beim Menschen zu prüfen.

## 2. Allgemeiner Überblick über Infektionen mit originären Kuhpockenviren, kuhpockenvirusähnlichen Erregern und Elefantenpockenviren

### 2.1. Definitionen

Kuhpocken sind eine durch "ORTHOPOXVIRUS BOVIS" bzw. durch ein ihm in seinen Eigenschaften eng verwandtes "KUHPOCKENÄHNLICHES VIRUS" hervorgerufene, kontagiöse, lokale oder allgemeine Viruserkrankung, die bei verschiedenen Tierarten auftritt.

Beim **Rind** kommt die Erkrankung meist endemisch vor und verläuft in der Regel mild. Dann treten Pockeneffloreszenzen lokal am Euter, an den Zitzen, beim Stier auch an den Hoden auf. Bisweilen verläuft sie auch als schwere Allgemeinerkrankung mit einer Virusgeneralisierung über den ganzen Körper, schweren Ulzerationen und Mastitiden.

Bei verschiedenen Zootieren, Hauskatzen und Nagetieren sind bis heute nur vereinzelte Infektionen mit Kuhpockenviren oder "kuhpockenvirusähnlichen Erregern" bekannt.

**Raubkatzen** der Gattung Carnivora, Familie Felidae erkranken meist an einer schlimmen, oft tödlich verlaufenden pulmonalen Form mit schweren, serofibrinösen Pleurobronchopneumonien und Pleuritiden. Seltener kommt es bei ihnen zu einer dermalen Form, die lokal mit wenigen Pockeneffloreszenzen, vor allem an Kopf, Körper und Extremitäten auftritt oder die als schwere Allgemeinerkrankung mit einem generalisierten Hautausschlag über den ganzen Körper verläuft.

Beim **Okapi**, **Riesenameisenbär** und **Breitmaulnashorn** werden ebenfalls milde lokalisierte und schwere generalisierte, dermale Formen beobachtet.

**Nagetiere** (Ratte, Rennmaus und Gelbziesel) erkranken sowohl an einer bösartigen, pulmonalen Verlaufsform mit schweren Pleurobronchopneumonien, als auch an einer mildereren, dermalen Form mit Pockeneffloreszenzen vor allem an den haarlosen Körperstellen.

Bei der **Hauskatze** kommen Kuhpocken bisher sporadisch vor und äußern sich meist als milde, lokale Erkrankung mit Pockeneffloreszenzen vor allem an Kopf und Extremitäten.

Der **Mensch** ist ebenfalls für das Kuhpockenvirus empfänglich. Er erkrankt allerdings nur sehr selten an lokalen Pockenläsionen, besonders an Händen, Armen und im Gesicht, wobei in Einzelfällen zusätzlich eine fieberhafte Lymphangitis, Lymphadenitis, schwere Konjunktivitis oder Meningoenzephalitis hinzukommen können.

**Elefantenpocken** werden durch ein Virus hervorgerufen, das bezüglich seiner biologischen Eigenschaften geringgradig vom Kuhpocken- bzw. Vacciniavirus abweicht und bei dem bisher nicht sicher geklärt ist, ob es sich um eine Vaccinia- bzw. Kuhpocken-Virus-Variante oder ein selbständiges Elefantenpockenvirus handelt. Es verursacht beim **Elefanten** sporadisch heftige Erkrankungen mit pustulös-ulzerativen Pockeneffloreszenzen an Haut und Schleimhaut, die selten von Exungulationen oder schweren Allgemeinerscheinungen mit tödlichem Ausgang begleitet sein können.

## 2.2. Geschichte und Vorkommen

Kuhpocken scheinen schon im Mittelalter und bis zur Mitte des vorigen Jahrhunderts eine häufige Krankheit beim Rind und auch beim Menschen gewesen zu sein, die nicht selten im Gefolge von Variolaepidemien auftrat. Seit Beginn des Jahrhunderts waren Kuhpocken in Deutschland eine seltene Krankheit, die beim Rind sporadisch oder eng begrenzt enzootisch verlief, während beim Menschen nur noch Einzelfälle bekannt wurden. In den meisten anderen Ländern schienen Kuhpocken endemisch vorzukommen, so in Holland, Österreich, Frankreich, England, Ungarn, Polen und in der Schweiz, aber auch in Amerika, Argentinien und Indien. Gelegentlich wurde von einer epidemischen Ausbreitung berichtet, so in England, Brasilien, Indien und Ruanda/Urundi (Potel, 1967 a).

Bei allen Berichten über Kuhpockenerkrankungen muß berücksichtigt werden, daß unter dem Begriff "Kuhpocken" lange Zeit verschiedene, ähnliche Krankheiten zusammengefaßt wurden, die alle durch Viren der Pockengruppe verursacht sind:

- "echte" Kuhpocken, hervorgerufen durch originäres Kuhpockenvirus (Orthopoxvirus bovis)
- Vacciniavirus-Infektionen, hervorgerufen durch Vacciniavirus (Orthopoxvirus commune)
- Euterpocken oder "falsche" Kuhpocken, hervorgerufen durch Euterpockenvirus (Parapoxvirus bovis 2)
- Stomatitis papulosa, hervorgerufen durch Stomatitis Papulosa-Virus (Parapoxvirus bovis 1).

Schon Jenner hatte 1798 im Rahmen seiner Untersuchungen zur Pockenschutzimpfung festgestellt, daß die sogenannten Kuhpocken in zwei Formen vorkamen, von denen nur eine gegen Variola schützte, doch erst 1935 erkannte Ledingham Kuhpocken erstmals als Krankheit sui generis und 4 Jahre später gelang Downie (1939 b) im Labor die erste Differenzierung zwischen originärem Kuhpocken- und Vacciniavirus. Erst nach der Isolierung von Parapoxvirus bovis 1 im Jahre 1959 (Plowright u. Ferris, 1959) und Parapoxvirus bovis 2 im Jahre 1963 (Moscovici et al., 1963) war es möglich, den verschiedenen Krankheiten ihren spezifischen Erreger zuzuordnen.

Nachfolgend soll die Bezeichnung "Kuhpocken" oder "Rinderpocken" der Erkrankung vorbehalten sein, die durch das "echte" oder originäre Kuhpockenvirus (*Orthopoxvirus bovis*) verursacht wird oder durch ein "kuhpockenähnliches Virus", das ihm in seinen Eigenschaften eng verwandt ist.

In den letzten 20 Jahren wurden beim Rind nur noch sporadische oder endemische Ausbrüche von Kuhpocken in Westeuropa und Großbritannien bekannt (Baxby, 1977 b). So beobachtete Dekking (1964) in Holland 28 Erkrankungen während eines unbekannten Zeitraums, Baxby (1977 b) beschrieb in Friesland 17 Fälle während eines Jahres und berichtete von fünf verschiedenen Erkrankungen in den Jahren 1965-1976 in England und Wales (Baxby, 1977 a).

Bis vor kurzem lagen keine Berichte über natürliche Kuhpockeninfektionen bei anderen Tierarten außer beim Rind vor. Erst in den letzten Jahren sind Erkrankungen bei den unterschiedlichsten Tierarten, vor allem bei Zootieren, in Europa beschrieben worden, die durch ein Kuhpockenvirus oder durch einen eng mit ihm verwandten "kuhpockenvirusähnlichen" Erreger verursacht wurden.

Im Kopenhagener Zoo in Dänemark erkrankten 1963 zwei, im Rotterdamer Zoo in Holland 1968 fünf Okapis (*Okapia johnstoni*) an Pocken (Basse et al., 1964; Zwart et al., 1971).

Im Moskauer Zoo brachen 1973 und 1974 zweimal kurz hintereinander unter Raubkatzen der Familie Felidae Pocken aus: drei Löwen (*Panthera leo*), ein schwarzer Panther (*Panthera pardus*), zwei Geparden (*Acinonyx jubatus*), ein Ozelot (*Felis pardalis*), fünf Pumas (*Felis concolor*), zwei Jaguare (*Felis onca*), einige Bengal- (*Felis bengalensis*) und Pallaskatzen (*Felis manul*) erkrankten an Kuhpocken, zwei Riesenameisenbären (*Myrmecophaga tridactyla*), die zusammen mit den Feliden im Raubtierhaus untergebracht waren, infizierten sich ebenfalls (Marennikova et al., 1975, 1976 a, 1977).

In England erkrankten 1977 in Whipsnade Park drei Geparden (Baxby et al., 1982).

Im zoologischen Garten Münster wurden 1977 Pocken bei zwei Breitmaulnas-hörnern (*Ceratotherium s. simum*) entdeckt (Schaller u. Pilaski, 1979).

Pockenerkrankungen beim Elefanten gab es wahrscheinlich schon seit 1925 in Europa in zoologischen Gärten und Zirkusunternehmen, sie erhielten so verschiedene Namen wie "Hufkrebs", "bösartige Haut- und Schleimhauterkrankung" oder "Maul- und Klauenseuche" (Mayer, 1973). Hammer (1939) sprach erstmals von einer Pockeninfektion beim Elefanten, ohne jedoch den Erreger nachzuweisen. Potel et al. (1963) isolierten 1960 bei einem kranken Elefanten des Leipziger Zoos erstmals den Erreger der Erkrankung und charakterisierten ihn "als der Pocken-Gruppe nahe verwandt". Seitdem erkrankten immer wieder sowohl asiatische (*Elephas maximus*) als auch afrikanische Elefanten (*Loxodonta africana*) in europäischen Zoos, Zirkusunternehmen oder Tiergärten, vor allem in der Bundesrepublik Deutschland und in der Deutschen Demokratischen Republik, seltener in anderen Ländern:

1960 und 1961 in Berlin (Dathe, 1966, 1967), 1962 in Erfurt (Spröbig et al., 1968), 1971 in Magdeburg (Kretzschmar und Köther, 1972; Kuntze et al., 1975) und 1971 in Stuttgart (Gehring et al., 1972; Mayer et al., 1972; Mayer, 1973), 1972 in Berlin (Kuntze, 1974; Kuntze u. Niemer, 1974), 1973 in Amsterdam (Pilaski et al., 1983), 1974 in Laxenburg bei Wien (Kubin et al., 1975), 1975 bei Ansbach (Gehring und Mayer, 1978), 1977 in Frankfurt/Main (Pilaski et al., 1985) und 1977 in Lodz (Malecki u. Zuchowska, 1980), 1979 bei Speyer (Pilaski et al., 1985) und in Reutlingen (Pilaski et al., 1983, 1985), 1980 in Berlin (Kuntze, 1982; Kuntze u. Janetzky, 1982) und Hameln (Pilaski et al., 1983) und 1984 in Hamburg (Pilaski et al., 1985).

Bei der Hauskatze (*Felis domesticus*) wurden erstmals 1978 in England Kuhpocken beschrieben (Thomsett et al., 1978). Inzwischen sind ca. 40 bis 50 Fälle bekannt, von denen die meisten in Süd- und Mittelengland auftraten (Bennett et al., 1986), zwei sind aus Schottland (Martin et al., 1984), je einer aus den Niederlanden (Willemse u. Egberink, 1985; Egberink et al., 1986) und aus Österreich (Schönbauer et al., 1982) bekannt.

Bei der Suche nach einem möglichen Virusreservoir wurde ein dem Kuhpockenvirus sehr ähnliches Virus bei Nagetieren in Rußland entdeckt: Krikun (1974) isolierte es 1973 in Turkmenistan aus einem Gelbziegel (*Citellus fulvus*) und einer Rennmaus (*Rhombomys opimus*), Marennikova et al. (1976 b, 1978 a) wiesen es zur gleichen Zeit bei erkrankten weißen Ratten (*Rattus albus*) in einer Moskauer Zuchtfarm nach.

## 2.3. Die Erreger

### 2.3.1. Klassifizierung

#### Kuhpockenvirus - kuhpockenähnliches Virus - Elefantenpockenvirus

Das Kuhpockenvirus läßt sich auf Grund seiner morphologischen, biologischen, physikalisch-chemischen, serologisch-immunologischen und antigenen Eigenschaften eindeutig klassifizieren. Es gehört als eigenständige Spezies mit der Bezeichnung: "ORTHOPOXVIRUS BOVIS" zum Genus: "ORTHOPOXVIRUS", Subfamilie: "CHORDOPOXVIRIDAE", Familie: "POXVIRIDAE" (Baxby, 1975 a; Fenner, 1979; Matthews, 1982).

Innerhalb der Spezies "Orthopoxvirus bovis" lassen sich zahlreiche Stämme unterscheiden. Als internationaler Referenzstamm gilt der Stamm "BRIGHTON" (Baxby, 1975 a). Daneben ruft das Kuhpockenvirus auch "weiße" Pockenmutanten hervor (Downie u. Haddock, 1952; Van Tongeren, 1952; Fenner u. Burnet, 1957; Fenner, 1958; Randle u. Dumbell, 1962; Baxby, 1969, 1972; Archard u. Mackett, 1979; Archard et al., 1984)

Verschiedene Kuhpockenvirusstämme differieren in ihren biologischen Eigenschaften. So wurden bis jetzt Unterschiede in der Wärmeresistenz, Hämagglutininbildung (Baxby, 1975 b), bei A-Einschlußkörperchen (Kato et al., 1963; Ichihashi u. Matsumoto, 1968; Baxby, 1975 b), in der Morphologie von Pocken auf der Chorioallantoismembran (CAM) (Ichihashi u. Matsumoto, 1968) und in der Virulenz für Mäuse (Fenner, 1958; Baxby, 1975 b) entdeckt.

Der Erreger der Pocken von Raubkatzen (Carnivorapoxvirus), Ameisenbären (Anteaterpoxvirus) und Nagern: Ratte (Ratpoxvirus), Rennmaus und Gelbziegel (Gerbilpoxvirus) wird in der Literatur von russischen Autoren als "kuhpockenähnliches oder -verwandtes Virus" klassifiziert:

"an agent similar to cowpox virus"  
 "a virus very closely related to cowpox"  
 "a virus very close to the cowpox virus"  
 "a virus which resembles cowpox virus"  
 (Marennikova et al., 1976 a, 1977, 1978 a, b).

Bei diesem Virus handelt es sich wahrscheinlich ebenfalls um ein originäres Kuhpockenvirus oder um eine Kuhpockenvirusvariante, die Bezeichnung "kuhpockenähnliches Virus" wurde lediglich auf Grund von Unterschieden in einigen biologischen Eigenschaften wie der Morphologie von Pocken auf der CAM, Bebrütungsgrenztemperatur im Ei und Virulenz für die weiße Maus gewählt.

So war das kuhpockenähnliche "Ratpox-, Carnivorapox- und Gerbilpoxvirus" weniger pathogen für die weiße Maus als der Kuhpockenvirusstamm "Brighton" (Marennikova et al., 1978 b), doch bereits Fenner (1958) und Baxby (1975 b) zeigten, daß einzelne Kuhpockenvirusstämme in der Virulenz für die Maus differieren.

Das kuhpockenähnliche "Ratpoxvirus" rief auf der CAM die gleichen Veränderungen hervor wie der Kuhpockenvirusstamm "CPX 188", während sich die Pocken der beiden Kuhpockenstämme "Brighton" und "CPX 188" in Größe, Aussehen und im Anteil der "weißen" Mutanten deutlich unterschieden (Marennikova et al., 1978 a). Auch Ichihashi u. Matsumoto (1968) beschrieben bei verschiedenen Kuhpockenvirusstämmen Variationen in der Größe und im Aussehen von Pocken auf der CAM.

Die Bebrütungsgrenztemperatur im Ei, die bei kuhpockenähnlichem "Ratpox-, Anteaterpox- und Carnivorapoxvirus" deutlich tiefer als beim Referenzstamm "Brighton" lag, wurde in allen Vergleichsuntersuchungen nur gegen ihn gemessen (Marennikova et al., 1977, 1978 a, b). Möglicherweise variieren aber auch einzelne Kuhpockenvirusstämme in der Grenztemperatur, wie es verschiedene Autoren bei Variolavirus beobachteten (Bedson et al., 1963; Marennikova et al., 1978 b).

Es ist bekannt, wie rasch z. T. Orthopockenviren durch Wirtswechsel oder Passagen in anderen biologischen Systemen einzelne Erkennungsmerkmale ändern oder verlieren können. Längere Adaptierungsfolgen in der Natur können zu einer wirtsspezifischen Selektion und zu einem Wirtsverlust für heterologe Systeme führen, so daß eine biologische Differenzierung dann nur unter Berücksichtigung von umfassenden Untersuchungen möglich ist (Fenner, 1958; Herrlich et al. 1963; Mahnel, 1974).

So scheint die Annahme berechtigt, daß die russischen Autoren mit der Bezeichnung "kuhpockenähnliches Virus" ein Kuhpockenvirus beschreiben.

Die Klassifizierung des Elefantenpockenvirus ist in der Literatur uneinheitlich.

So wurden einmal Elefantenpocken "durch ein Vaccinia-Virus verursacht" (Spröbig et al., 1968; Gehring et al., 1972), bzw. zeigte der Erreger "teilweise mit Vakzinevirus, teilweise mit Kuhpockenvirus identische Reaktionen" (Kuntze u. Niemer, 1974). In anderen Berichten hieß es, daß "sich der Erreger in seinen wesentlichen Eigenschaften wie Kuhpockenvirus verhält und deutlich von Vakzinevirus unterscheidet", "antigenetisch dem Vacciniavirus sehr nahe steht und möglicherweise als eigene Spezies den Pocken zuzuordnen ist" (Kretzschmar u. Köther,

1972) bzw. "an Eigenschaften erinnert, die beim originären Kuhpockenvirus beschrieben wurden" (Kubin et al., 1975) oder "in die Gruppe der kuhpockenähnlichen Viren eingeordnet wird" (Pilaski et al., 1983, 1985), um dann wieder als ein "eigenes Elefantenpockenvirus, z. T. als Variante von Vacciniavirus" charakterisiert zu werden (Mahnelt, 1974) und schließlich auch als ein "eigenes Elefantenpockenvirus" vorgeschlagen wurde, "obwohl es mit Vaccinia- und noch enger mit Kuhpockenvirus verwandt ist" (Baxby u. Ghaboosi, 1977).

Die verschiedenen Elefantenpockenvirusisolate verhalten sich in ihren biologischen Eigenschaften sehr unterschiedlich. Bisher ist jedoch nicht geklärt, ob es sich beim Elefantenpockenvirus um eine selbständige Tierpockenspezies handelt oder ob eine Variante von Vacciniavirus bzw. eine Mutante des Kuhpockenvirus vorliegt (Mayr et al., 1984).

Ohne weitere, insbesondere molekulargenetische Untersuchungen ist es derzeit nicht möglich, zweifelsfreie Zuordnungen zu treffen. Deshalb wird nachfolgend das Kuhpocken- oder kuhpockenähnliche Virus nach der Tierart, von der es isoliert wurde, bezeichnet.

| englische Bezeichnung | deutsche Bezeichnung<br>im Text | Abkürzung  | Virus<br>isoliert aus |
|-----------------------|---------------------------------|------------|-----------------------|
| Cowpoxvirus           | Kuhpockenvirus                  | KuP-Virus  | Rind                  |
| Carnivorapoxvirus     | Carnivorapockenvirus            | CarP-Virus | Raubkatze             |
| Anteaterpoxvirus      | Ameisenbärpockenvirus           | AntP-Virus | Ameisenbär            |
| Okapipoxvirus         | Okapipockenvirus                | OkP-Virus  | Okapi                 |
| Elefantpoxvirus       | Elefantenpockenvirus            | EP-Virus   | Elefant               |
| Catpoxvirus           | Katzenpockenvirus               | CatP-Virus | Katze                 |
| Ratpoxvirus           | Rattenpockenvirus               | RatP-Virus | Ratte                 |
| Gerbilpoxvirus        | Gelbzielepockenvirus            | GerP-Virus | Gelbziegel            |
| Rhinocerospoxvirus    | Nashornpockenvirus              | RhP-Virus  | Nashorn               |

### 2.3.2. Morphologie

Das **KuP-Virus** ist wie alle Orthopockenviren quaderförmig aufgebaut und besteht aus einer äußeren Proteinhülle, zwei Lateralkörpern und dem Innenkörper (Core, Nucleoid), der die doppelsträngige DNS enthält (Mayr et al., 1984).

Die äußere Proteinhülle besteht aus einer Doppelmembran, in die unregelmäßig tubuläre Filamente eingelagert sind. Nach speziellen Präparationsmethoden ist im Innenbezirk des Virus ein mehr oder weniger rechteckiges Core zu sehen, das von spikes-ähnlichen Fortsätzen palisadenartig umgeben wird. Im Core findet sich eine fadenförmige Spirale aus fibrillär aufgebauten Proteinfäden, die die 10 nm starke, doppelsträngige DNS umgibt. Die beiden Lateralkörper liegen zwischen der äußeren Doppelmembran und dem Fortsätzen des Cores (Mayr et al., 1974).

Die Größe von Orthopockenviren wird mit 200-300 x 100-260 nm (Nakano, 1977) und 235-280 x 165-190 nm (Mayr et al., 1984), das Achsenverhältnis (Länge:Breite) mit 1,3:1 (Mayr et al., 1984) angegeben.

**CatP-Virus** ist 300-350 x 130-240 nm groß (Schönbauer et al., 1982; Martland et al., 1983, 1985; Bennett et al., 1985) und oval bzw. quaderförmig aufgebaut (Martland et al., 1983, 1985).

Die Größe von **EP-Virus** beträgt 300 x 250 nm (Kubin et al., 1974). Es ist quaderförmig (Spröbig et al., 1968; Kubin et al., 1974; Pilaski et al., 1985) und aus einem Innenkörper, zwei Lateralkörpern und einer äußeren Proteinhülle (Spröbig et al., 1968) mit charakteristischer Oberflächenstruktur (Kubin et al., 1974) aufgebaut.

### 2.3.3. Biologische Eigenschaften

#### 2.3.3.1. Züchtung im bebrüteten Hühnerei

Das Kuhpockenvirus läßt sich gut auf der Chorioallantoismembran (CAM) von 10 bis 12 Tage alten Hühnerembryonen vermehren.

Nach Herrlich u. Mayr (1955) bildete KuP-Virus bei 37,5 °C am 3. Tag ca. 2 bis 3 mm große, flache, scharf von der Umgebung abgegrenzte Herde mit zentraler Nekrose, die, anders als bei Vac-Virus, stark hämorrhagisch waren. Die Umgebung war stark getrübt, das gesamte Gefäßsystem stark ausgebildet. Histologisch ließ sich eine Proliferation des Ektoderms nachweisen, der zentrale Lysisprozeß der proliferierten und degenerierten Zellen setzte später als bei Vac-Virus ein. Im stark verdickten und zellig infiltrierten Mesoderm kam es zu Stase und Thrombosen an den Gefäßen und zu Gefäßwandschäden mit perivaskulären, ausgedehnten Blutaustritten. Im Zytoplasma fanden sich einige wenige, große, kompakte, homogene, stark azidophile Einschußkörperchen in allen drei Keimblättern, besonders gut ausgebildet vor allem in den proliferierten Epithelzellen. Nach 70 bis 82 Stunden kam es in der Regel zur Generalisation mit Ausbildung von eng aneinander liegenden Sekundärherden. Die Titerwerte veränderter Membranbezirke am Höhepunkt der primären Virusphase lagen zwischen  $10^6$  und  $10^9$ , kein Ei überlebte die Infektion. Bei Beimpfung der Allantoishöhle ging die Infektion im Gegensatz zu Vac-Virus sehr schlecht an, ihr Verlauf verzögerte sich stark, doch trat die hämorrhagische Natur der Herde besonders stark in Erscheinung. Verschiedene Stämme unterschieden sich im Zeitpunkt und in der Quantität der sichtbaren Generalisation auf der CAM.

Diese Befunde stimmen mit denen von Downie (1939 a) und Fenner (1958) überein.

Verschiedene KuP-Virusstämme riefen bei Ichihashi u. Matsumoto (1968) 5 Tage p.inf. Pocken unterschiedlicher Größe (zwischen 2,5 und 4,0 mm) auf der CAM hervor.

Nach Gispén (1955) bildete KuP-Virus kompakte, homogene, azidophile, runde Einschußkörperchen, vor allem in den Ektodermzellen von infizierten Membranen, die manchmal so groß waren, daß die Zellkerne mondsichelförmig an die Zellwand gedrückt wurden, während die von Vac-Virus weniger zahlreich, kleiner, unregelmäßiger und granulierter waren.

Mahnel (1974) kam zu anderen Ergebnissen. Verschiedene KuP-Virusstämme (unter ihnen "Brighton" und "weiße" Varianten) verursachten bei 37-37,5 °C auf der CAM am 4. Tag flache, ca. 1,5 bis 2 mm große Primärpocken mit schwacher Proliferation ohne zentrale Nekrosen, die zum Teil, aber nicht mehr regelmäßig, deutliche Hämorrhagien aufwiesen. Bei einer Impfdosis von 50-100 PBE (pockenbildende Einheiten) kam es bis zum 5. Tag p.inf. bei allen Eiern zur Generalisation, 70 bis 100 % starben ab. Bei Impfung in die Allantoishöhle haftete KuP-, ähnlich wie Vac-Virus, sehr gut.

Unterschiedliche Stämme von Vac-Virus bildeten etwas größere Primärpocken mit ebenfalls schwacher Proliferation, die teilweise zentrale Nekrosen und Hämorrhagien aufwiesen; die Stämme unterschieden sich in der Morphologie sowie der Virulenz für das Ei kaum, bei Beimpfung der Allantoishöhle überhaupt nicht vom KuP-Virus.

Downie u. Haddock (1952) sowie Van Tongeren (1952) isolierten aus KuP-Virusstämmen, die auf der CAM gezüchtet wurden, eine "weiße" Variante, die bei 1 % aller Pocken auftrat und bei der Hämorrhagien fehlten. Die 2 bis 3 mm großen, gelb- oder grauweißen Pockenläsionen entstanden durch eine schnelle Nekrose des infizierten Epithels mit starker polymorphkerniger Leukozyteninfiltration. Die "weißen" Varianten konnten in reiner Form erhalten und weiter kultiviert werden.

Die durch "weiße" Varianten gebildeten Herde zeigten die gleichen Einschlusskörperchen wie das "rote" Elternvirus (Fenner, 1958).

Nach Baxby (1969) wurde der Anteil solcher "atypischer" weißer Pocken durch Umweltfaktoren, wie Alter und Herkunft des Hühnerembryos, Bebrütungstemperatur und Lage der CAM, beeinflusst. Da die "roten" KuP-Viren durch Hämorrhagien bzw. durch Schädigung der Blutgefäße und die "weißen" Mutanten durch Leukozyteninfiltration charakterisiert waren, wurden die hämatopoetischen und Gefäßsysteme möglicherweise durch Umwelteinflüsse mitgeschädigt. Der Pockencharakter auf der CAM schien daher nicht so geeignet zur Identifizierung von roten und weißen Mutanten und ihren Elternviren zu sein, so daß Baxby die intradermale Beimpfung der Kaninchenhaut empfahl.

RatP-, CarP-, AntP-, OkP- und GerP-Virus bildeten am 3. Tag bei einer Bebrütungstemperatur von 37 °C flache, oberflächliche, im Durchmesser 1 bis 1,5 mm große, gräuliche Pocken mit einem hämorrhagischen Zentrum. Weniger als 1 % (Marennikova et al., 1976 a, 1978 b) oder 2 bis 4 % (Marennikova et al., 1977) aller Pocken waren ca. 1,8 mm groß, dicht und ohne Anzeichen von Hämorrhagien (Marennikova et al., 1976 a, 1977, 1978 a, b).

Marennikova et al. (1978 b) beobachteten, daß bei RatP-Virus mit zunehmender Eiadaptierung Pocken und Hämorrhagien größer und der Anteil der weißen Pocken zahlreicher wurden.

Für den Hühnerembryo waren RatP-, CarP- und GerP-Virus hochpathogen, die LD<sub>50</sub> lag unter 10<sup>1</sup> PFU/0,1 ml, die Virusakkumulation in der Leber betrug ca. 10<sup>8,5</sup> PFU/g. KuP-Virus "Brighton" verhielt sich ähnlich (Marennikova et al., 1978 b).

CatP-Virus rief auf der CAM 1 bis 2 mm große, ulzerierte, hämorrhagische Pocken hervor, 1 bis 2 % der Veränderungen waren dabei weiße Mutationen. (Gaskell et al., 1983; Bennett et al., 1985; Egberink et al., 1986).

Das EP-Virus vermehrt sich ebenfalls gut auf der CAM.

Bei Mahnel (1974) bildete der EP-Virusstamm "EP-1" bei einer Dosis von 50-100 PBE am 4. Tag bei 37-37,5 °C flache, im Durchmesser 1,5 bis 2 mm große Primärpocken, die keine zentrale Nekrose, dafür aber deutlich ausgeprägte Hämorrhagien und eine schwache Proliferation aufwiesen. Die Virulenz für den Embryo war gering: bis zum 5. Tag kam es zu keiner Generalisation, die Embryonen starben nicht ab. Bei Beimpfung in die Allantoishöhle haftete EP-Virus selbst bei einer Infektionsdosis von 10<sup>5</sup> ID<sub>50</sub> nicht am Entoderm der CAM.

EP-Virus ließ sich bei Mahnel (1974) gut von KuP-bzw. Vac-Virus abgrenzen.

Andere EP-Virusstämme unterschieden sich ebenfalls deutlich von Vac-Virus, ähnelten im Pockencharakter auf der CAM und in der Virulenz sehr stark dem KuP-Virus.

So beobachteten Kubin et al. (1975) nach der Beimpfung mit EP-Virus "EP/74" nach 48 Stunden kleine, graue Herde, die nach 72 Stunden deutliche Hämorrhagien aufwiesen. Die Sekundärherde waren ebenfalls klein, grau und hämorrhagisch.

Kretzschmar u. Köhler (1972) beschrieben für EP-Virus "EPV 3/Stendal" ebenfalls die gleichen Veränderungen auf der CAM wie bei KuP-Virus: gewölbte, oberflächlich schwach nekrotische, leicht proliferative, deutlich hyperämische Pockenherde, die generalisierten. Der Embryo starb nach 8. Tagen ab.

Im Gegensatz dazu beschrieben Sprößig et al. (1968) einen EP-Virusstamm, der auf der CAM genau wie Vac-Virus flache, scharf begrenzte Herde mit zentraler Nekrose ohne Hämorrhagien auf der CAM hervorrief.

Die Grenzbebrütungstemperatur, die als maximale Temperatur, bei der sich Virus noch auf der CAM vermehrt, definiert ist, beträgt für das KuP-Virus 40,0 °C (Bedson u. Dumbell, 1961; Baxby, 1975 a)).

Die Grenztemperaturen für RatP-, CarP- und GerP-Virus lagen bei 38,6 °C (Marennikova et al., 1977, 1978 a), die von AntP-Virus bei 39,0 °C (Marennikova et al., 1976 a). EP-Virus vermehrte sich bis 39,0 °C (Baxby et al., 1979 b), CatP-Virus bis 40,0 °C (Thomsett et al., 1978).

So rief KuP-Virus "Brighton" bei Marennikova (1976 a, 1978 a) bei 40,5 °C noch kleine Veränderungen auf der CAM hervor, bei RatP-, GerP-, CarP-, AntP- und CatP-Virus bildeten sich keine Pockenherde mehr.

### 2.3.3.2. Züchtung in Zellkulturen

Das **KuP-Virus** vermehrt sich gut in Säugetier-, Menschen- und Hühnerembryo-Zellkulturen.

Mahnel (1974) züchtete verschiedene KuP-Virusstämme in Hühnerembryofibroblasten-(HEF) und Kälberhoden-(KH)zellen. Es bildeten sich runde Plaques, die meistens aus einem lytischen Zentrum, in bestimmten Phasen der Plaqueentwicklung aus ringartigen, angefärbten Innenzonen mit gröberen und feineren Zellfragmenten und aus einem meist undeutlichen, seltener deutlichen wallartigem Rand aus leicht proliferierenden Zellen bestanden. Ihr Aufbau war nicht immer typisch und ließ sich am besten zwischen dem 5. und 7. Tag p.inf. erkennen. In HEF-Kulturen variierte ihre Größe sehr stark von 1,5 bis 4 mm, in KH-Kulturen von 0,25 bis 1 mm.

Rondle (1967) beobachtete, daß die Kaninchennierenzelllinie RK 13 empfänglicher für KuP-Virus war als die CAM. Für die "weiße" Variante hatten RK 13-Zellen nur eine geringe Empfänglichkeit. Umgekehrt war es bei HeLa-Zellen.

Matthews (1970) untersuchte die Vermehrungseigenschaften von KuP-Virus in primären Hamsterzellkulturen. Erst 72 Stunden p.inf. kam es zu einer stetigen Vermehrung mit maximalen Titern am 6. Tag.

**RatP-, CarP-, GerP- und KuP-Virus** bildeten bei Marennikova et al. (1978 b) in primären HEF-Kulturen gleichartige, im Durchmesser ca. 2,3 bis 2,5 mm große, netzförmige Plaques. Bei bestimmten Infektionsdosen entstanden herdförmige, proliferative Plaques, später wurde der ganze Zellrasen zerstört. Im gefärbten Präparat waren eosinophile A- und basophile B-Einschlußkörperchen zu sehen.

Marennikova et al. (1976 a, 1977) vermehrten CarP- und AntP-Virus in Humanembryofibroblasten und Schweinenierenzellen. 72 Stunden p.inf. kam es zu einer runden Plaquebildung mit scharfen, gezahnten Rändern und einem netzähnlichen, unregelmäßig geformten, durchschnittlich ca. 2 mm großen Zentrum, dessen Zellen lysierten. Nach der Anfärbung mit fluoreszierenden Antikörpern waren Plaques schon 24 h p.inf. zu erkennen. EP- und OkP-Virus bildeten sehr ähnliche plaqueartige Veränderungen, zum Vac-Virus bestanden deutliche Unterschiede.

Die zytopathischen Veränderungen von **CatP-Virus** begannen bei 35 °C nach 24 Stunden (Bennett et al. 1985). Nach 48 Stunden waren auf embryonalen Katzen-(FEA), Affennieren- (Vero), Kaninchennieren- (RK-13), Babyhamsternieren-

(BHK-21) und humanen Embryolungenzellen (HEL) sternförmige, ca. 1 mm große Plaques zu sehen; auf fetalen Rinderlungen- (BFL) und fetalen Rinderhodenzellen (BFT) waren die Plaques größer, runder und es kam zu Synzytienbildung.

Eine HämadSORption von vaccinia-sensitiven Hühnererythrozyten war in allen infizierten Zellkulturen mit Ausnahme von embryonalen Katzenzellen nachweisbar; in allen Zellarten mit Ausnahme der Verozellen fanden sich eosinophile A-Einschlußkörperchen, die nach Egberink et al. (1986) in Verozellen besonders groß sein sollten.

Bei Gaskell et al. (1983) kam es in mit CatP-Virus infizierten diploiden Katzenembryozellen nach 24 bis 36 Stunden zu ersten Zellveränderungen und zur Synzytienbildung.

Auch das EP-Virus vermehrt sich in vielen Zellarten (Gehring et al., 1972; Kretzschmar u. Köther, 1972; Mahnel, 1974; Kubin et al., 1975; Baxby u. Ghaboosi, 1977).

Einzelne EP-Virusstämme unterscheiden sich in ihren Vermehrungseigenschaften in der Zellkultur deutlich von KuP- und Vac-Virus.

So bildete EP-Virus "EP-1" bei Mahnel (1974) in HEF am 6. Tag p.inf. 2 bis 3 mm große, diffuse, fleckartige, unscharf begrenzte Plaques, in denen degenerierte oder proliferierende Zellen lagen, die zum Teil netzartig miteinander verbunden waren. Größe und Gestalt der Plaques waren relativ stabil. In primären KH-zellen wurden die Plaques nur 0,5 bis 1 mm groß, ihre Gestalt ähnelte zunächst der oben beschriebenen, später wurde das Plaquezentrum lytisch und ringartige, angefärbte Innenzonen mit gröberen oder feineren Zellfragmenten und ein etwas undeutlicher Randwall bildeten sich. EP-Virus ließ sich durch die Größe und Gestalt seiner Plaques relativ gut von KuP-Virus und Vac-Virus unterscheiden.

Auch bei Baxby u. Ghaboosi (1977) bildete EP-Virus in RK 13- und Verozellkulturen Plaques, die kleiner als bei Vac- und KuP-Virus waren.

Andere EP-Virusstämme unterschieden sich in ihren Vermehrungseigenschaften in der Zellkultur zwar deutlich von Vac-Virus, ähnelten aber denen von KuP-Virus.

EP-Virus "EP/74" vermehrte sich bei Kubin et al. (1975) in primären Ferkelhoden-Kälberschilddrüsen-, Pferdenieren-, embryonalen Rindernieren-, Schweinenierenzellen und HEF sowie in sekundären Kälberhoden- und Schweinedrüsenzellen und in den Zelllinien BHK, IB-RS-2, PK 15 und PF 15 mit ersten plaqueähnlichen Veränderungen am 3. Tag p.inf.. Die Virusreplikation war selbst in höheren Passagen gering, sie erreichte nur in Ferkelhodenzellen, HEF und BHK-Kulturen mehr als  $10^5$  KID<sub>50</sub>. Mitgetestetes Vac-Virus vermehrte sich schneller und intensiver. In HEF-Kulturen war eine HämadSORption von Hühnerythrozyten nachweisbar.

Auch bei Kretzschmar u. Köhler (1972) verhielt sich EP-Virus "EPV 3/Stendal" in Schweinethyreoidea-, Kälberhoden- und HEF-Zellkulturen wie KuP-Virus. In Kälberhodenkulturen wurden die Zellen an den spindeligen bzw. polygonalen Zellgrenzen stärker lichtbrechend, quollen auf oder schrumpften mit Trübung des Plasmas und zerfielen schließlich. Nach 3 bis 4 Tagen entstanden Plaques, in deren Zentren degenerierte Zellen lagen und es kam zur Riesenzellbildung. Infizierte Zellen adsorbierten Meerschweinchenerythrozyten nur wenig.

Weder KuP- noch AntP-, CarP- und EP-Virus vermehrten sich nach Osborn et al. (1984) in infizierten, zur Arginin-Biosynthese nicht fähigen Mäusesarkom-188- und HEF-zellen, wenn im Zellmedium kein Arginin oder nur Citrullin zugegeben war. Bei Zugabe von Arginin ins Medium wuchsen sie schlecht mit niedrigen Infektiositätstitern. Vac-Virus wuchs in argininfreien oder citrullinhaltigen Zellmedien schlecht, bei Zugabe von Arginin jedoch hervorragend.

Bei Bedson (1982) verminderte Thymidin-Triphosphat (TTP) in Babyhamsterniezellen die Thymidinkinasebildung von KuP-Virus, EP-Virus und GerP-Virus kaum. Zellen, die mit Vac-Virus infiziert waren, wurden stark gehemmt.

### 2.3.3.3. Züchtung im Versuchstier

Im Experiment sind folgende Tiere für das KuP-Virus empfänglich: das Rind, verschiedene Nagetiere, das Kaninchen, die Katze und das Huhn.

#### 2.3.3.3.1. Rind

Die experimentelle Infektion des Rindes mit KuP-Virus verläuft mild und bleibt lokal auf die Haut begrenzt.

Berger u. Puntigam (1958) und Puntigam u. Berger (1958) skarifizierten Rinder mit KuP-Virus.

Die Inkubationszeit betrug gewöhnlich 2 bis 7 Tage. Die Krankheit begann mit einem mäßigen (39,5 °C) Fieber, das etwa 10 Tage dauerte. Gleichzeitig mit dem Fieber oder kurz darauf bildete sich ein örtlich begrenzter Pockenausschlag. Er begann mit einer umschriebenen Rötung, die erst in eine Papel (Stadium papulosum), dann zu einem Bläschen (Stad. vesiculosum) und schließlich zu einer typischen Pockenpustel (Stad. pustulosum) mit einem zentralen Nabel (Nekrose) heranreifte. Die zentralen Nekrosen reichten tief ins Bindegewebe, dadurch wirkten die Pusteln flach. Vom Zentrum her trocknete die Pustel ab dem 4. Tag zu einer Kruste ein, die zunächst fest saß und dann ab dem 14. bis 18. Tag abfiel. Häufig zeigten Hautveränderungen einen hämorrhagischen Einschlag, die Krusten erschienen deshalb auch dunkler, oft blauschwarz (Downie, 1939 a; Herrlich, 1967).

Im Blutbild beobachteten Puntigam u. Berger (1958) zu Beginn der Krankheit innerhalb der Normalwerte eine äußerst geringgradige Leukopenie und später eine minimale Leukozytose. Die neutrophilen Granulozyten verhielten sich zweiphasisch. Zusätzlich kam es zu einer geringgradigen Hyperglobulinämie, der Gesamtcholesteringehalt nahm geringgradig ab.

Insgesamt verlief das Krankheitsbild beim KuP-Virus nicht so akut wie beim Vac-Virus: Inkubationszeit und Krankheitsverlauf waren länger, die Symptome milder (Herrlich 1967; Berger u. Puntigam, 1958).

Für CatP-Virus und EP-Virus scheint das Rind wesentlich weniger empfänglich zu sein.

Martin et al. (1984) beschrieben nach der intradermalen Infektion mit CatP-Virus ab dem 5. Tag eine leichte Rötung und Schwellung. Vereinzelt entstanden 0,8 bis 2,5 cm große Knoten, die sich später ohne Ulzerationen zurückbildeten.

Kubin et al. (1975) skarifizierten die Haut eines Kalbes mit EP-Virus "EP/74". Am 5. Tag hatten sich einzelne, ca. 5 mm große Pusteln mit zentralen Hämorrhagien gebildet, die über das normale Hautniveau kaum hervortraten und am 7. Tag den Höhepunkt der Reaktion erreichten. Es trat nur leichtes Fieber auf. Insgesamt verlief die Infektion sehr protrahiert.

#### 2.3.3.3.2. Nagetiere

Während früher im Experiment vorwiegend die Maus das Versuchstier der Wahl für das KuP-Virus war, wurden in jüngerer Zeit für Forschungen zur Epizootiologie von RatP- und GerP-Virus vor allem Ratten, Rennmäuse und Gelbziegel verwendet.

##### 2.3.3.3.2.1. Maus

Die Maus läßt sich intrazerebral, intravenös, intradermal und intranasal mit KuP-Virus infizieren.

#### INTRAZEREBRALE (i.cer.) Infektion:

Moritsch (1957 a) infizierte Mäuse i.cer. mit KuP-Virus. Störungen des Allgemeinbefindens begannen 2-3 Tage p.inf.. Am Schwanz traten bambusähnliche Kontrakturen auf. Als äußerlich sichtbares Zeichen einer Generalisation zeigten die Mäuse eine Rhinitis und schwere Konjunktivitis. Sie starben schließlich unter anfallsweisen Krämpfen, zu Lähmungen kam es nie.

KuP-Virus verursachte bei i.cer. Infektion eine starke Virusvermehrung im Gehirn. Pathologisch-histologisch wiesen die Epithelzellen im Plexus chorioideus und im Ependym der Ventrikel intrazytoplasmatische Einschlusskörper auf, auch ein Übergreifen der Entzündung auf das subependymär gelegene Gewebe war zu sehen (Moritsch, 1957 b).

Nach Mims (1960) kam es bei i.cer. Infektion zu einer Meningitis.

Fenneg (1958) stellte fest, daß KuP-Virus nur selten Mäuse nach i.cer. Infektion mit  $10^5$  PBE tötet.

Nach Marennikova et al. (1978 a, b) waren **RatP-, CarP-, GerP-** und KuP-Virus "CPX 188" bei der i.cer. Infektion sehr stark, KuP-Virus "Brighton" weniger und Vac-Virus am wenigsten pathogen für die Maus.

Kubin et al. (1975) infizierten Mäuse verschiedenen Alters mit **EP-Virus** "EP/74" i.cer.. 50 bis 80 % starben nach protrahiertem Verlauf.

### INTRAVENÖSE (i.v.) Infektion:

Bei Mims (1968) war die Symptomatik der **KuP**-Infektion von der Virusdosis abhängig. Wenn  $10^8$  pockenbildende (PBE) injiziert wurden, bildeten sich am 3. Tag, bei mehr als  $10^6$  PBE erst am 6. Tag Hautveränderungen am Schwanz, an den Füßen, der Schnauze, den Ohren und den Urogenitalgebieten. Oft fand sich eine Konjunktivitis.

Dabei vermehrte sich das Virus in den Endothel- und Perikapillarzellen der kleinen Venen, besonders der Haut und schädigte dabei die Gefäßwände, so daß es zu Blutaustritten kam. Die Erythrozyten wurden teils phagozytiert, teils über die abführenden Lymphbahnen in den Ductus thoracicus transportiert. Die Bildung von Hämolympfknoten konnte als konstantes charakteristisches Merkmal einer tödlichen KuP-Virusinfektion gelten.

Von den Endothelien der Gefäße breitete sich die Infektion in die Epidermis aus, wo es zu Zellnekrosen und entzündlichen Reaktionen kam.

Eine Virusvermehrung wurde auch in den Endothelzellen der portalen und hepatischen Venen der Leber beobachtet, derenzufolge sich kleine Herde bildeten (Downie, 1939 a).

Wurden massive Virusdosen (mehr als  $10^9$  PBE) verimpft, starben die Mäuse bereits innerhalb von 16 bis 36 Stunden perakut an schweren Leberschäden (Mims, 1968).

Die Kupffer-Zellen ließen das Virus dann durch die Sinuswände passieren und es kam zu einer ausgeprägten Nekrose der Leberzellen mit Blutansammlungen in den betroffenen Stellen. Der Vermehrungszyklus des Virus blieb unvollständig, da weder signifikante Virus- noch Antigenmengen nachgewiesen werden konnten (Mims, 1968).

### INTRAPERITONEALE (i.p.) Infektion:

Bei Moritsch (1956, 1957 a) vermehrte sich **KuP-Virus** so stark in den inneren Organen, wie Milz und Leber, daß die Mäuse regelmäßig zwischen dem 4. und 7. Tag nach einer i.p. Infektion starben. Im Gehirn fand sich nur eine geringe Virusmenge, die durch hämatogene Aussaat bedingt war.

Alle mit **EP-Virus** i.p. infizierten Saugmäuse starben genau wie mit Vac-Virus infizierte Mäuse bis zum 9. Tag p.inf. (Kubin et al., 1975), bzw. ab dem 3. Tag p.inf. bis zu einer Verdünnung von  $10^4$  (Gehring et al. 1972).

### INTRADERMALE (i.d.) Infektion:

Mims (1960, 1968) infizierte Mäuse i.d. mit **KuP-Virus**. Sie erkrankten lediglich an lokalen Hautveränderungen, eine Generalisierung schien nicht stattzufinden. Das KuP-Virus vermehrte sich sehr stark in der Haut.

Nach intraplantarer Injektion wurden Titer von  $10^{10}$  PBE/g beimpfter Fußsohle gefunden (Mims, 1968).

Marennikova et al. (1978 a, b) beschrieben bei **RatP-Virus** eine niedrigere Pathogenität als für KuP-Virus "Brighton" und "CPX 188".

### INTRANASALE (i.n.) Infektion:

Nach i.n. Infektion mit **KuP-Virus** kam es bei Mims (1960) zu Prozessen in den oberen und unteren Luftwegen.

Maiboroda et al. (1980) infizierten Mäuse i.n. mit **RatP-Virus**.

Babymäuse erkrankten 4 bis 10 Tage p.inf. akut an einer Pneumonie und starben, abhängig von der Virusdosis zu 50 bis 100 %.

Bei jungen, 1 bis 1,5 Monate alten Mäusen, verschlechterte sich das Allgemeinbefinden nach 6 bis 10 Tagen p.inf., und nicht selten traten eine seröse, hämorrhagische oder purulente Konjunktivitis, eine Tachy- und Dyspnoe auf. Bei einigen Mäusen bildeten sich ab dem 11. bis 13. Tag an Ohren, Lippen, Kopf, Schwanz und Pfoten Pocken, die später verkrusteten. Viele Mäuse starben innerhalb von 8 bis 18 Tagen..

Erwachsene, 4 Monate alte Mäuse erkrankten erst nach Applikation sehr hoher Virusdosen an gleichartigen Symptomen wie jüngere Mäuse.

Demnach war das Virus für Babymäuse und Jungtiere wesentlich virulenter als für erwachsene Tiere: die Letalität lag bei Babymäusen 1000x, bei der jungen Maus 10x höher als bei der erwachsenen Maus.

Pathologisch-anatomisch fanden sich in der Lunge eine knotige, lobuläre Bronchopneumonie und eine interstitielle Pneumonie mit einem ausgeprägten perivaskulärem Ödem und herdförmigen Hämorrhagien, eine katarrhalische und hämorrhagische Jejunitis, eine diphtheroide Colitis mit Ulcera, während deutlich ausgeprägte Hämorrhagien und Nekrosen in Leber und Milz, wie sie bei einer Infektion mit Ek-Virus vorkamen, fehlten. Auf der Haut beobachtete man hämorrhagische Pokken (Maiboroda et al., 1980).

RatP-Virus besaß nach Maiboroda et al. (1980) eine ausgeprägte Pulmotropie. Es vermehrte sich, unabhängig vom Alter der Tiere, am besten in der Lunge, weniger in der Niere, seltener in der Leber und nie in der Milz.

#### 2.3.3.3.2.2. Ratte

Junge Wanderratten, die Maiboroda (1982) intranasal mit RatP-Virus infizierte, erkrankten 7 bis 8 Tage p.inf. an Konjunktivitis, Rhinitis, Dyspnoe und Hautveränderungen und starben größtenteils bis zum 13. Krankheitstag.

Bei am Schwanz skarifizierten, jungen Ratten verlief die Infektion milder und protrahierter. Gelegentlich kam es zu einer Mutilation der Pfoten.

Bei erwachsenen Ratten verlief die Erkrankung protrahiert, viele Ratten starben 10 bis 35 Tage p.inf..

Pathologisch-anatomisch ließen sich eine hämorrhagische Pneumonie und hämorrhagische Magen- und Darmveränderungen feststellen. Am Schwanz und an den Ohren fanden sich zahlreiche Pockenläsionen, die später von Krusten bedeckt waren.

Zwischen dem 7. und 13. Tag waren hohe Viruskonzentrationen in der Lunge und im Rektum nachweisbar; Leber, Milz, Nieren und Hoden waren weniger virushaltig.

Junge und alte Ratten schieden zwischen dem 11. und 35. Tag p.inf. Virus mit dem Urin und der Faeces aus (Maiboroda, 1982).

RatP- und CarP-Virus waren bei weißen Ratten nach i.n. Infektion weniger pathogen als GerP- und KuP-Virus "Brighton". Bei Wanderratten erwiesen sich RatP-, GerP- und KuP-Virus geringgradig weniger pathogen als CarP-Virus. Für Vac-Virus waren die Tiere nicht empfänglich (Marennikova et al. 1978 a, b).

### 2.3.3.3.2.3. Rennmaus und Gelbziegel

Marennikova et al. (1978 b) infizierten Rennmäuse und Gelbziegel mit **GerP-Virus** und verglichen klinisches Erscheinungsbild, Mortalität und Virusmanifestation nach intranasaler, intrakutaner, kutaner, oraler und pedaler Infektion.

Die Rennmäuse erkrankten bei allen Infektionsarten (Ausnahme: kutane Infektion) generalisiert an Husten, Dyspnoe und Konjunktivitis. Bei peroraler und intranasaler Infizierung starben alle Tiere, bei intradermaler und intrapedaler Inokulation verendeten nur 57 bzw. 30 %. Die kutane Infektion rief nur lokale Hautveränderungen hervor. Virus ließ sich ab dem 5. Tag p.inf. im Blut, in inneren Organen und im Urin nachweisen, kein Tier starb.

In der Leber fanden sich multiple, stecknadelkopfgroße, weiße Nekroseherde, pathologische Veränderungen waren ferner in der Lunge, in inguinalen Lymphknoten, im Hoden und im Darm nachweisbar (Marennikova et al., 1978 b).

Das Gelbziegel war für GerP-Virus empfänglicher als die Rennmaus. Die Tiere litten an einer hochgradigen Dyspnoe und starben 7 bis 12 Tagen p.inf. an einer fortschreitenden Auszehrung. Gelegentlich kam es nach intranasaler Infektion zu Hautveränderungen an der Nase und den Lippen. Bei allen Infektionsarten betrug die Mortalität 100 % (Marennikova et al., 1978 b).

Die pathologisch-anatomischen Veränderungen waren ähnlich wie bei der Rennmaus, doch fehlten die Leberveränderungen (Marennikova et al., 1978 b).

Am Höhepunkt der Erkrankung ließ sich GerP-Virus, abhängig von der Art der Infizierung, aus der Lunge, Leber, Milz, Niere, den Hoden, Lymphknoten und aus dem Blut und Urin isolieren. Das Virus persistierte bis zu 5. Wochen p. inf. in den inneren Organen, selbst wenn äußerlich schon keine Veränderungen mehr sichtbar waren (Marennikova et al., 1978 b).

### 2.3.3.3.3. Kaninchen

Kaninchen können auf verschiedene Weise mit **KuP-Virus** infiziert werden: intrakutan, kutan, intravenös, korneal und intrazerebral.

### INTRAKUTANE (i.c.) Infektion (Methode nach Groth, 1921)

Nach Herrlich u. Mayr (1954) entwickelte sich bei intrakutan mit **KuP-Virus** "Verlinde" infizierten Kaninchen an der Infektionsstelle zunächst ein flaches Infiltrat, das nach 48 Stunden von petechialen Blutungen begleitet wurde, die rasch zunahmen und zwischen dem 3. und 4. Tag die Infektionsstelle überzogen. Die hämorrhagische Entzündung breitete sich flächig aus, zentral wurde das Gewebe eingeschmolzen. Am 5. Tag fand sich in der Mitte ein nekrotisches schwarzes Zentrum, das von einer schmalen, anaemischen Zone und einem breiten, tiefroten, hämorrhagischen Bezirk umgeben war, der nicht scharf abgegrenzt, in die Umgebung überging. Um den Herd war die Haut bläulich verfärbt und stark verdickt. Der Höhepunkt der Reaktion lag um den 6. Tag. Zwischen dem 5. und 6. Tag senkte sich die Entzündung nach ventral. Im Unterhautbindegewebe bildete sich ein starkes Ödem aus, das aus sulziger, gelatinöser, meist bakterienfreier und hochvirulenter Flüssigkeit bestand und sich bis in die Gegend des Unterbauchs absenkte. Starke Allgemeinsymptome begleiteten die lokalen Hautveränderungen. Zwischen dem 4. und 6. Tag traten Sekundäreffloreszenzen an den enthaarten Hautstellen und Schleimhäuten des Digestions- und Respirationstrakts auf. Die Tiere waren apathisch, magerten stark ab und hatten hohes Fieber. Nach 10 bis 14 Tagen starben 50 - 60 % von ihnen.

Diese hämorrhagische Entzündung war charakteristisch für eine Infektion mit KuP-Virus und eindeutig von einer durch verschiedene Vac-Virusstämme hervorgerufenen Reaktion abgrenzbar.

Fenner (1956) gelang diese Unterscheidung nicht. Er beobachtete sowohl bei Vac-Virusstämmen als auch bei KuP-Virus "Brighton" und "Amsterdam" hämorrhagische Hautveränderungen.

Mahnel (1974) beschrieb bei KuP-Virusstämmen (darunter "Brighton") eine sich rasch entwickelnde, relativ leichte Schwellung, die kaum nekrotisierend und nur z. T. hämorrhagisch war und am 3. bis 4. Tag ihren Höhepunkt erreichte. Ab dem 5. Tag begann die Heilung, in der Regel war die Läsion nach 8 bis 10 Tagen abgeheilt. Die Reaktion verlief sehr mild und schnell ab, während sie bei Vac-Virus stärker und länger ausgeprägt war.

Diese gegenüber den Angaben von Herrlich und Mayr (1954) unterschiedliche Symptomatik erklärte Mahnel durch die Verwendung von kulturadaptiertem Virus, während bei früheren Untersuchungen ausnahmslos Dermo- oder Eihautvirus

verwendet wurde, das z. T. sehr lange auf der Kaninchenhaut oder auf der CAM passagiert worden war.

Dies bestätigte die Befunde von Fenner u. Haddock (1952) sowie Dumbell et al. (1957), wonach die Kaninchenhaut für das KuP-Virus erheblich empfindlicher als die CAM war, sich deshalb zur Züchtung des Virus besser eignete und eine gleich gute Empfänglichkeit für "weiße" und "rote" KuP-Virusstämme aufwies.

**RatP-, CarP- und GerP-Virus** riefen beim Kaninchen nach intradermaler Infektion genauso wie KuP-Virus "Brighton" 25 mm dicke Hautinfiltrate, die im Zentrum nekrotisch waren, hervor (Marennikova et al. 1977, 1978 a, b).

**EP-Virus** führt bei i.c. Infektion zu Veränderungen der Kaninchenhaut, die abhängig vom verwendeten Virusstamm unterschiedlich beschrieben sind.

Der EP-Virusstamm "EP-2" rief entzündete und ödematöse Hautläsionen ohne Hämorrhagien und Nekrosen hervor, die sich gut von Veränderungen durch KuP- oder Vac-Virus "Brighton" abgrenzen ließen (Baxby u. Ghaboosi, 1977).

EP-Virus "EP-1" hingegen wies kaum zentrale Nekrosen auf, dafür aber eine stärkere hämorrhagische Tendenz, die Abheilung erfolgte langsam. Die Reaktion verlief stärker als bei Vac-Virus (Mahnel, 1974).

Der Virusstamm "EP/74" führte zu einer milden Infiltratbildung, die im Vergleich zum Vac-Virus weniger stark und deutlich protrahiert ablief (Kubin et al. 1975).

Ein EP-Virusstamm rief gut abgegrenzte Hautinfiltrate mit zentralen Läsionen mit und ohne hämorrhagische Reaktionen hervor (Gehring et al., 1972; Sprößig et al., 1968), die denen von Vac-Virus ähnelten.

Baxby et al. (1979) verglichen CarP-, EP- und KuP-Virus am Kaninchen. CarP-Virus rief die stärkste Reaktion hervor, es führte zu sehr ausgeprägten Nekrosen in der Haut und verursachte bei einer Minimalinfektionsdosis von 0,03 PFU einen generalisierten Rash. Bei EP- und KuP-Virus entstanden keine starken Nekrosen und die Minimalinfektionsdosen von EP- (200 PFU) und von KuP-Virus (0,1 PFU) führten nicht zur Generalisierung.

**KUTANE (kut.) INFEKTION (Skarifikation)** (Methode Calmette-Guerin, 1901; modifiziert nach Herzberg, 1935)

Nach Herrlich (1967) entwickelten sich am Kaninchen bei kut. Infektion mit **KuP-Virus** wenig erhabene und mehr flächige Pusteln, deren hämorrhagisches Zentrum sich peripherwärts ausbreitete und bald den ganzen Herd umfaßte. Die Randzonen und das darunter liegende Gewebe waren stark ödematös verändert, die Nekrosen breit und im Zentrum tiefblau gefärbt. Es kam zur Bildung verschiedenfarbiger roter Höfe (Ringzonen). Die hämorrhagischen Pusteln verheilten nur lang-

sam, sie hafteten oft viele Wochen lang als schwärzlichblaue Krater fest an der Haut. Regelmäßig kam es zu einer Generalisierung auf der Haut und den Schleimhäuten, die bis zu Todesfällen führen konnte.

Kaninchen, die kutan mit KuP-Virus "Brighton" infiziert wurden, entwickelten am 4. oder 5. Tag hämorrhagische Papeln, selten kleine Blasen.

Van Tongeren (1954) beobachtete dagegen nach kutaner Infektion mit KuP-Virus hämorrhagische Pusteln, Ödembildung und starke lokale Entzündungserscheinungen.

RatP-, CarP- und GerP-Virus bildeten papulo-pustuläre, konfluierende, hämorrhagische Hautveränderungen, die an allen haarlosen und rasierten Hautstellen sichtbar wurden und den Läsionen, hervorgerufen von KuP-Virus "Brighton" und "CPX 188" ähnelten (Marennikova et al. 1977, 1978 a, b).

Gehring et al. (1972) skarifizierten Kaninchen mit EP-Virus und erhielten für Vac-Virus typische Pusteln.

#### INTRAVENÖSE (i.v.) Infektion:

Downie (1939 a) infizierte Kaninchen i.v. mit KuP-Virus "Brighton". Neben perakuten Verlaufsfällen, bei denen es am 4. Tag ohne Ausbildung von Hautveränderungen zu Todesfällen kam, reagierten andere Tiere mit schweren Störungen des Allgemeinbefindens und entwickelten ein generalisiertes Exanthem.

#### KORNEALE Infektion

Nach Berger (1956) verursachte die korneale Infektion mit KuP-Virus erst 3 Tage p.inf. kraterförmige Epitheldefekte, die am 5. Tag p.inf. mit 2,5 bis 3 mm kleiner und weniger ausgeprägt als jene von Vac-Virus waren.

Die Epithelnekrosen waren nach Downie (1939 a) geringer und verliefen langsamer als bei Vac-Virus, das mesodermale Gewebe wurde stärker befallen.

Die infizierte Kornea enthielt zusätzlich zu großen A- auch kleinere B-Einschlußkörperchen (Kato et al., 1959).

Kubin et al. (1975) wiesen 48 Stunden nach der Infektion mit EP-Virus "EP/74" erste Veränderungen auf der Kornea mit Fluoreszeinlösung nach. 72 Stunden p.inf. waren die Herde 1 mm groß und zeigten einen zentralen Epitheldefekt. Fast

jede Zelle enthielt Einschußkörperchen. Bei Vac-Virus verlief die Reaktion schneller und ausgeprägter und Zahl, Größe der Einschußkörperchen war geringer.

#### 2.3.3.3.4. Hauskatze

Die Katze wurde bisher nur mit CatP-Virus intravenös und kutan infiziert (Gaskell et al., 1983).

I.v. mit CatP-Virus infizierte Katzen erkrankten schwer. Die Futteraufnahme war ab dem 6. Tag reduziert, am 9. Tag entwickelten sich an der Infektionsstelle am Hals multiple Hautläsionen, die nach einigen Tagen verschorften. Zwischen dem 11. bis 16. Tag bildete sich ein Ödem um Hals und Nacken, vor allem um die Injektionsstelle, das sich bis ins Gesicht und auf der Injektionsseite über die Brust, den ventralen Thorax bis zur Vordergliedmaße ausbreitete. Die Katzen wurden depressiv, exsikkotisch und starben nach ca. 2 Wochen.

Pathologisch-anatomisch beeindruckte ein ausgeprägtes Ödem am ventralen Nacken, Thorax und Abdomen. Die Hautläsionen am Hals zeigten ein ausgedehntes Entzündungsgeschehen mit Nekrose der Muskeln, des Bindegewebes und der Gefäße und reichlich fibrinös-hämorrhagischem Exsudat. In Makrophagen, Fibroblasten und Endothelzellen fanden sich Einschußkörper. Die Lunge war durch eine interstitielle Pneumonie und einen geringgradigen Pleuraerguß verändert.

Bei den Katzen, die am Nacken kutan infiziert wurden, bildeten sich lokal an der Infektionsstelle einige wenige, kleine, proliferative Hautläsionen, die konfluieren. Wegen des intensiven Juckreizes kratzten sich die Katzen ständig.

Das Bindegewebe und die Muskulatur in der Umgebung der Hautveränderungen waren nekrotisch verändert und mit fibrinös-hämorrhagischem Exsudat durchtränkt.

#### 2.3.3.3.5. Huhn

Mayr (1966) infizierte Hühner kutan am Oberschenkel (Federfollikelmethode). Vac-Virus rief immer typische Pocken hervor, beim KuP-Virus verlief die Hautreaktion stets negativ.

Die **EP-Virus**stämme "EP-1" und "EP/74" hafteten bei der Follikelmethode ebenfalls nicht (Mahnel, 1974; Kubin et al. 1975).

Gehring et al. (1972) beschrieben bei EP-Virus eine milde verlaufende, spezifische Follikelreaktion.

### 2.1.3.6. Physikalisch-chemische Eigenschaften

Das KuP-Virus hat ähnliche physikalische und chemische Eigenschaften wie Vac-Virus (Andrews, 1964).

Das Teilchengewicht des KuP-Virus beträgt  $3200 \times 10^6$  Dalton, das DNS-Gewicht  $160 \times 10^6$  Dalton. Ihr Sedimentationskoeffizient liegt bei 47S, was einem Mol.-Gewicht von  $80 \times 10^6$  Dalton entspricht (Joklik, 1962, 1966).

Die DNS ist aus 18 % Guanin, 18 % Cytidin, 32 % Adenin und 32% Thymidin zusammengesetzt (Fraenkel-Conrad, 1969).

Die Tenazität von KuP-Virus gegenüber physikalisch-chemischen Einflüssen entspricht weitgehend der Widerstandsfähigkeit von Vac-Virus (Mahnel, 1987).

KuP-Virus ließ sich analog zu Vac-Virus durch Hitze ( $56^\circ\text{C}$ , 15 min lang), kurzzeitige UV-Strahlung und Einwirkung von chemischen Wirkstoffen wie Formalin, Natronlauge, Chlorbleichlauge, Jod, Peressigsäure, Wasserstoffperoxid und quartären Ammoniumverbindungen inaktivieren. War das Virus zellgebunden, kam es zu einer deutlichen Erhöhung der Tenazität.

### 2.3.5. Antigenverwandtschaft

Die immunologischen Beziehungen zwischen KuP- und anderen Orthopockenviren wurden in zahlreichen Untersuchungen erforscht.

Als älteste Methode zur Differenzierung von Orthopockenviren dienten serologische Tests wie die Neutralisation (N), die Hämagglutination (HA) bzw. Hämagglutinationshemmung (HAH), die Komplementbindung (KB) oder die Präzipitation (P). Da die serologische Differenzierung der Orthopockenviren durch die auftretenden Kreuzreaktionen erschwert wird, liegt eine Möglichkeit, die Spezifität zu erhöhen, in der mehrmaligen Absorption von homologen und heterologen Immunsereen an das zu untersuchende Virus.

Davies et al. (1938) stellten erstmals fest, daß das KuP- und Vac-Virus verschiedene Viren sind.

Dies bestätigten weitere Untersuchungen, die aber gleichzeitig auch eine enge Verwandtschaft zwischen einzelnen Pockenviren erkennen ließ.

So waren mit KuP- oder Vac-Virus infizierte Kaninchen kreuzweise gegen eine erneute Infektion geschützt (Downie, 1939 b). Die Elementarkörperchensuspensionen von KuP-, Var-, Vac- und Ek-Virus neutralisierten im Kreuzneutralisationstest unverdünnte Immunsereen auf der CAM und Kaninchenhaut identisch (Downie u. McCarthy, 1950). Im HA-, KB- und N-Test reagierten die Antigene von KuP-, Var-Vac- und EK-Virus mit dem homologen Hyperimmunserum nur geringgradig stärker als mit den heterologen Immunsereen (Downie, 1939 b; Downie u. McDonald, 1950), so daß Downie (1939 b) beim KuP-Virus ein hitzelabiles L- und ein hitzestabiles S-Antigen vermutete, wie es Craigie u. Wishart (1934, 1936) und Parker und Rivers (1935) kurze Zeit vorher bei Vac-Virus entdeckt hatten.

Erst nach vorhergehender Absorption von homologen und heterologen Hyperimmunseren lag in der N und KB der Titer des homologen Serums deutlich über dem der heterologen, so daß antigenetische Differenzen zwischen einzelnen Pockenviren zu vermuten waren (Downie, 1939 b; Downie u. McCarthy, 1950; Downie u. McDonald, 1950).

Hinweise auf Unterschiede im antigenen Aufbau von Pockenviren ließen sich vor allem mit Hilfe des **Gel-Diffusions-Tests** gewinnen.

So wies Gispén (1955) mit Hilfe des Gel-Diffusions-Tests geringe Differenzen in den löslichen Antigenen von KuP- und Vac-Virus nach. Vac-Virus bildete beim Kreuzversuch mit beiden Seren zwei deutliche Hauptpräzipitationslinien I und III und bis zu vier schwache Nebenfraktionen. KuP-Virus präzipitierte eine III-Hauptlinie und bis zu zwei schwächere Nebenlinien, darunter

eine schwache I-Linie, die sich in ihrer Diffusions- oder Präzipitationsfähigkeit deutlich von Vac-Virus unterschied.

Rondle u. Dumbell (1962) demonstrierten für KuP-Virus "Brighton" neun, bei Vac-Virus zehn Präzipitationslinien gegen die Antiseren und ordneten jeder Linie eine Antigenkomponente (lpc= line pattern component) a-k zu. Eine "f"-lpc war in Vac-infiziertem Gewebe sehr leicht, in KuP-infiziertem Gewebe nur nach Trypsineinwirkung, eine "d"-lpc hingegen bei KuP- aber nicht bei Vac-Virus nachweisbar, obwohl "f"- und "d"-Antikörper in beiden Antiseren zu finden waren. Bei "weißen" KuP-Virus-Stämmen fehlte die "d"-lpc ganz. Rondle u. Dumbell erklärten die unterschiedlichen lpc durch verschiedene Oberflächenantigene von KuP- und Vac-Virus, wobei die "f"-lpc anscheinend dem LS-Antigenkomplex von Vac-Virus entsprach.

Baxby u. Rondle (1968) bestimmten bei Vac- und KuP-Virus 10 gemeinsame Antigenkomponenten (lpc 1-10), während lpc 11 nur in Vac-Virus infizierten Zellen, lpc 13 und lpc d nur in KuP-Virus infizierten RK 13-Zellen zu finden war.

Bei Baxby (1972) besaßen KuP- und Vac-Virus je 5 Oberflächenantigene: Vac-Virus wies ein sogenanntes 3-, 4-, 5-, 7- und 10-Antigen auf, wobei das 3- und 5-Antigen dem L- und S-Antigen gleichzusetzen war (Rondle u. Williamson, 1968). Beim KuP-Virus ließ sich ein 4-, 8-, 9-, 10- und d-Antigen auf der Oberfläche nachweisen, wobei das d-Antigen bei "weißen" KuP-Virusstämmen nicht vorhanden war.

CarP-, AntP-, OkP- und EP-Virus präzipitierten gegen Vac-Antiserum die gleichen Banden wie KuP-Virus "Brighton", während zu den Linien von Vac- und Ek-Virus deutliche Unterschiede bestanden (Marennikova et al. 1977, 1978 a) .

Zur deutlicheren Differenzierung von Orthopockenviren verwendeten Maltseva u. Marennikova (1976) einen 2-Stufen-Präzipitationstest. CarP-, AntP-, EP- und OkP-Virus bildeten die gleichen Präzipitationslinien wie KuP-Virus und waren antigen mit ihm identisch, während Vac-, Var- und AP-Virus zusätzliche Linien aufwiesen.

In allen Präzipitationstests waren KuP-, CarP-, AntP-, OkP- und EP-Virus im Antigenaufbau identisch, zu Vac-Virus bestanden hingegen deutliche Unterschiede.

Antigene Unterschiede waren ebenfalls durch die **Kreuzneutralisation** nachweisbar.

So neutralisierten KuP- und Vac-Virus Antiseren, die mit Hilfe von vermehrungsfähigem bzw. hitzeinaktiviertem Virus gewonnen worden waren, sehr unterschiedlich, obwohl bei beiden Viren gemeinsame hitzelabile Antigene beteiligt schienen, während andere Oberflächenantigene, darunter das klassische LS-Antigen, hierbei nicht wirksam waren (Baxby, 1979).

KuP- und EP-Virus hingegen reagierten mit Antiseren gegen inaktiviertes Virus identisch, mit Antiseren gegen vermehrungsfähiges Virus ähnlich, so daß zwischen beiden Viren eine enge Verwandtschaft bestand (Baxby, 1977 c).

In Kreuzneutralisationstests mit kreuzadsorbierten Antiseren konnten Baxby u. Ghaboosi (1977) KuP-Virus ein X- und d-Oberflächenantigen, EP-Virus ein X-, Y- und d-Antigen und Vac-Virus ein X-, Y- und Z-Antigen zuordnen.

In weiterführenden Untersuchungen fand Baxby (1982) bei Orthopocken vier verschiedene Oberflächenantigene (Antigen 1-4), die in der Neutralisation eine Rolle spielten. Sie waren z.T. so auf der Oberfläche lokalisiert, daß sie nicht von ihren Antikörpern neutralisiert werden konnten. Baxby postulierte zusätzlich ein 5. "blocking"-Antigen, daß die Neutralisation von Antigen 2 verhindern sollte. KuP-Virus "Brighton" und Car-Virus "Moskow" besaßen beide Antigen 1, (allen Orthopockenviren gemeinsam und verantwortlich für deren Kreuzimmunität) und Antigen 4, das nicht von Antikörpern neutralisiert wurde. EP-Virus "EP-2" wies Antigen 1, 2 und 4 und das "blocking"-Antigen 5 auf, während sich die verschiedenen Vac-Virusstämme in ihren Antigenmustern von allen anderen Orthopockenviren unterschieden.

Bei Payne (1986) unterschied sich extrazelluläres KuP-Virus von seiner intrazellulären Form durch spezifische Hüllantigene und -proteine. Umhülltes, extrazelluläres KuP-Virus "Brighton" wurde von Antikörpern, die gegen Vac-Virus-Oberflächenantigene gerichtet waren, neutralisiert, nicht jedoch von Antikörpern, die gegen intrazelluläres "nacktes" Vac-Virus gebildet worden waren.

Pockenviren lassen sich auch durch die Unterschiede in ihren Virusstrukturproteinen differenzieren.

Dazu werden intakte Viruspartikel oder -teile durch Dissoziation mit stark ionisierenden Substanzen (z.B. SDS: Sodium-Dodecylsulfat) in ihre einzelnen Polypeptide aufgespalten und dann in der Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE) aufgetrennt (Laemmli, 1970). Die Proteine werden nach ihren Molekulargewichten (MG) in Dalton ( $10^3$  D = 1 KD) bezeichnet. Polypeptide mit gleichem MG müssen nicht identisch sein, während verschiedene native Proteine in Polypeptide mit identischem MG dissoziiert werden können. Wegen der unterschiedlichen Methodik ist es schwierig, die Ergebnisse von verschiedenen Autoren direkt zu vergleichen. (Turner u. Baxby, 1979).

Arita u. Tagaya (1980) verglichen gereinigte Orthopockenvirussuspensionen anhand der unterschiedlichen Polypeptidmuster ihrer Strukturproteine in der SDS-PAGE. Die Muster aller Orthopockenviren ähnelten sich sehr stark, nur im MG-Bereich von 30-40 KD bestanden Unterschiede zwischen Var-, Vac-, AP- und KuP-Virus. Die in England gewonnenen KuP-Virusstämme "Brighton" ("rot und weiß") differierten von drei in den Niederlanden isolierten KuP-Virusstämmen "Amsterdam, 50, 51" durch eine zusätzliche Bande im MG über 47 KD. Die niederländi-

schen Stämme unterschieden sich untereinander geringgradig, ähnelten aber den Mustern von europäischen Vac-Virusstämmen, was auf enge Verwandtschaft schließen ließ.

Turner u. Baxby (1979) differenzierten die kompletten Virionen von verschiedenen Orthopockenviren anhand ihrer Polypeptide in der SDS-PAGE und versuchten die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine jeweils einem Strukturelement des Virions zuzuordnen. Intakte Virionen verschiedener Orthopockenviren unterschieden sich durch ihre Polypeptidmuster in den drei MG-Bereichen: 20-25, 30-40, 50-60 KD. KuP-Virus "Brighton" und CarP-Virus "Whipesnade" waren durch ihr spezifisches Muster (23, 34, 37 KD) von allen anderen Orthopockenviren abgrenzbar, EP-Virus "EP 1 u. 2" und CarP-Virus "Moskow" wiesen das gleiche Polypeptidmuster (23, 34 KD) wie Ek-Virus auf, während die drei Vac-Virusstämme ein Muster von 23, 34, 53 KD hatten. Durch die Behandlung der zunächst intakten Virionen mit Detergentien wurde gezeigt, daß die Polypeptide, die die Differenzierung ermöglichten, auf der Oberfläche oder unter ihr lokalisiert waren.

Nach Harper et al. (1979) unterschieden sich Orthopockenviren durch die späten intrazellulären Polypeptide, die sich 16 Stunden p.inf. gebildet hatten. KuP-Virus "Brighton" ("rot und weiß"), RatP- und CarP- Virus "Moscow" und "Whipesnade" besaßen Polypeptide mit einem MG von 98 und 177 KD, während Vac-Virus Polypeptide mit einem MG von 98 und 102 KD aufwies.

Diese charakteristischen intrazellulären Proteine waren nach Meinung der Autoren möglicherweise keine eigentlichen Virionpolypeptide, sondern Vorläuferproteine des späteren Viruspartikels. Sie erlaubten aber eine deutlichere Unterscheidung als komplette Virionen, die neben den eigentlichen Strukturproteinen noch Vorläufer- und Nichtstrukturproteine und virusinduzierte Enzyme enthielten.

Eine weitere Möglichkeit zur Differenzierung ermöglichte die Gel-Diffusion mit anschließender SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese.

Ikuta et al. (1979 a) präzipitierten bei KuP- und Vac-Virus mit einem Antiserum, das gegen LS-Antigen gewonnen worden war, vier gemeinsame Polypeptide. Sie unterschieden sich nur in einer LS-Antigen-Hauptkomponente, die bei Vac-Virus ein MG von 100 KD, bei KuP-Virus ein MG von über 60 KD aufwies.

Payne (1986) fand nach der Immunpräzipitation von KuP- und Vac-Virus gegen ein Vac-Antiserum mit anschließender SDS-PAGE bei beiden Viren gemeinsame Glykoproteine mit MG von 20-23 und 42 KD und zusätzliche, voneinander verschiedene Glykoproteine (KuP-Virus: 44-, 76-, 103- und 145 KD-Glykoprotein,

Vac-Virus: 89-, 110- und 165 KD-Glykoprotein), die, obwohl im MG verschieden, antigen miteinander verwandt waren. KuP- und Vac-Virus besaßen ein nicht glykolisiertes 37 KD-Hüllprotein.

Ikuta et al. (1979 b) gelang es nicht, kreuzreaktive Polypeptide zwischen zwei Pockengenera nachzuweisen. KuP- und Vac-Virus (Genus: Orthopoxvirus) und Shope Fibroma-Virus (Genus: Leporipoxvirus) präzipitierten mit dem Antiserum des anderen Pockengenus zwar früh und spät auftretende Polypeptide, ein gemeinsames Polypeptid gleichen MG war nicht zuzuordnen.

Eine relativ neue Methode zur Differenzierung von Pockenviren ist die **DNS-Restriktionsanalyse**.

Das Genom von Pockenviren besteht aus einem doppelsträngigen, linearen, basengepaarten DNS-Molekül, das eine Länge von ca. 75-80  $\mu\text{m}$  und ein MG von  $118-133 \times 10^6$  Dalton hat und aus 3,2 % der Virusmasse besteht. (Wittek, 1982; Mayr, 1984)

Die enge Verwandtschaft der Orthopockenviren ist genetisch bedingt, die einzelnen Virusspezies und -varianten unterscheiden sich in wenigen Basenpaaren (Kern, 1987).

Unterschiede in den Nukleotidsequenzen von verschiedenen Genomen werden durch die DNS-Restriktionsanalyse festgestellt, bei der die gereinigte Virus-DNS durch verschiedene bakterielle Restriktionsenzyme in einzelne Bruchstücke gespalten wird, die in der Agargel-Elektrophorese aufgetrennt werden. Jeder Pockenspezies läßt sich ein spezifisches Muster aus Restriktionsbruchstücken zuordnen. Dies erlaubt die Identifikation und Klassifikation von Pockenvirusisolaten.

Nach Müller et al. (1978) unterschied sich das DNS-Restriktionsmuster von KuP-Virus gleichermaßen von Vac- und Ek-Virus-DNS-Mustern.

Mackett u. Archard (1979) verglichen die Gen-Restriktionskarten von Orthopockenviren und fanden nach Hybridisierung von Restriktionsbruchstücken aus Genomen verschiedener Orthopockenviren, daß der zentrale Bereich des DNS-Strangs bei Orthopockenviren (MG von  $30 \times 10^6$ ) in einer Länge von 25-65  $\mu\text{m}$  hochgradig konserviert und stabil war, wobei zu 73-94 % homologe Nukleotidsequenzen auftraten. Die terminalen Enden des DNS-Strangs, die aus sich wiederholenden Nucleotidsequenzen gebildet wurden, variierten je nach Virusart in Basensequenz und -länge, an ihren Enden fanden sich kovalente Brückenbindungen.

KuP-Virus "Brighton" (MG von ca.  $145 \times 10^6$ ) war nach Archard u. Mackett (1979) 23 bis 29 Megadalton größer als Vac-Virus (MG von  $124 \times 10^6$ ), was durch zusätzliche terminale Sequenzen an beiden Enden begründet wurde. Im Endbereich des DNS-Strangs fanden sich bei KuP-Virus Wiederholungssequenzen, die teilweise

homolog zu denen von Vac-Virus waren, während sich der zentrale Bereich beider Viren von über 75 Megadalton als hochgradig konserviert erwies.

Die weiße KuP-Variante entstand aus rotem KuP-Virus durch Deletion endständiger Sequenzen nur an einem Ende des Virusgenoms, wobei sie bei 9 von 11 weißen Varianten einen Bereich von 21 Megadalton (restliche 2 Varianten 24 bzw. 27 Megadalton) umfaßte und eine terminale Wiederholungssequenz betraf. Das Ende wies z.T. im Gegensatz zum roten KuP-Virus keine kovalenten Brückenbindungen auf. In diesem Bereich waren reparierte Abschnitte zwischen 3 bis 27 Megadalton nachweisbar, bei denen zur Kompensation der terminalen Wiederholungssequenz und der kovalenten Brückenbindung unterschiedlich große Sequenzbereiche des anderen terminalen Endes invert vervielfältigt worden waren (Archard et al., 1984).

Pilaski et al. (1986) verglichen die Restriktionsenzymprofile von verschiedenen EP-, OkP- und RhP-Virusstämmen mit KuP-, AntP-, Vac- und Ek-Virus.

Seit kurzem lassen sich sehr eng verwandte Viren mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern (MAK) differenzieren.

Die Antigenstruktur der großen Pockenviren ist aufgrund der vielfältigen Strukturelemente sehr komplex. Während polyklonale Antikörper in Immunseren deshalb gegen eine Vielzahl von antigenen Determinanten unterschiedlicher Präferenz gerichtet sind, reagieren monoklonale Antikörper nur mit einer antigenen Determinante aus dem Antigenpool (Kern, 1984).

Kitamoto et al. (1984, 1987) beschrieben die Entwicklung von MAK durch Fusion einer permanenten Myelomzelllinie mit Milzzellen von Mäusen, die mit KuP-Virus bzw. zwei Vac-Virus-Stämmen hyperimmunisiert wurden. Es entstanden verschiedene Klassen von MAK, die gegen das Nucleoprotein-, LS-, Hämagglutinin- und Oberflächen- Antigen und gegen die Einschlußkörper vom Typ A gerichtet waren. Mit ihrer Hilfe identifizierten Kitamoto et al. (1987) die Polypeptide der Hauptantigene.

In mit KuP-Virus infizierten Zellen wiesen Kitamoto et al. (1986 b) Einschlußkörper vom Typ A durch MAK, die gegen sie gerichtet waren, 6-9 Stunden p.inf. nach und identifizierten erstmals 12 Stunden p.inf. in der SDS-PAGE ein Polypeptid mit einem MG von über 160 KD. In Zellen, die mit Vac-Virus infiziert waren, wurde kein Polypeptid gefunden.

Mit 3 verschiedenen Klassen von MAK, die gegen bestimmte antigene Determinanten des A-Einschlußkörpers (sogenannte stammspezifische KuP- bzw. Ek-Virus-spezifische AK und Orthopoxvirus-spezifische AK) gerichtet waren wiesen Kitamoto et al. (1986 a) nicht nur Unterschiede in den antigenen Determinanten zwischen KuP- und Ek-Virus, sondern auch zwischen verschiedenen KuP-Virusstämmen nach. Bei Vac-Virus trat ein analoges Antigenauf, obwohl Vac-Virus keine A-EK bildet.

### 2.3.6. Einschlußkörperchen

Bei der Vermehrung von KuP-Viren kommt es in infizierten Zellen zur Bildung von intrazytoplasmatischen B- und A-Einschlußkörperchen (EK).

B-Einschlußkörperchen oder basophile EK wurden von allen Orthopockenviren in infizierten Zellen gebildet. Sie stellten intrazytoplasmatisch gelegene "Virusfabriken" dar, in denen die Virusvermehrung stattfand (Kato et al., 1959) und erschienen in einem frühen Stadium der Virusvermehrung. Mit dem Elektronenmikroskop ließen sich in ihnen besondere Virusvorstufen nachweisen. Sie waren klein und unregelmäßig geformt, färbten sich mit Giemsa oder Hämatoxylin-Eosin basophil an und konnten mit fluoreszierenden Antikörpern nachgewiesen werden, die Feulgen-Reaktion war positiv. Sie entsprachen den "Guarnieri Körperchen" (Kato et al., 1959).

KuP-Viren bildeten in infizierten Zellen außerdem A-Einschlußkörperchen oder azidophile EK. Sie entstanden erst in einem späten Stadium der Virusvermehrung, ihre Rolle ist noch nicht geklärt (Kato u. Kamahora, 1962). Sie waren groß (z.T. größer als der Zellkern), rund oder oval, färbten sich mit Giemsa oder HE azidophil an, reagierten Feulgen-negativ und ließen sich nicht mit fluoreszierenden Antikörpern nachweisen. Nach Downie, der sie 1939 a erstmals beschrieb, wurden sie Downie'sche EK genannt.

Bei KuP- und Ek-Viren fanden sie sich in nahezu allen (100 %) infizierten Zellen A-EK, während sie bei allen anderen Orthopockenviren fast nie (weniger als 0, 1%) in infizierten Zellen vorkamen (Amano u. Tagaya, 1981).

Nach Kato et al. (1963) waren im Phasenkontrastmikroskop bei einigen KuP-Virusstämmen die reifen Viruspartikel im oder auf dem A-EK lokalisiert (sogenannter V+ Charakter), während sie bei anderen Stämmen im Zytoplasma versteckt lagen (V- Charakter). Der V+ und V- Charakter war ein genetisch stabiles Merkmal, die Nachkommenviruspartikel wiesen den gleichen "V Charakter" wie die Elternviruspartikel auf.

Bei kombinierten Infektionen mit 2 Pockenviren (V- und V+) erwies sich der V+ über den V- Charakter als dominant. Bei Doppelinfektion mit einem V+ KuP-Virusstamm und einem Vac-Virusstamm, der keine A-EK bildete, zeigten alle Nachkommenviren V+ Charakter, so daß die für den V Charakter und für die Bildung der A-EK zuständigen Gene nicht zu einem einfachen Genom gehören konnten.

Der V Charakter bestand demnach aus zwei Merkmalen: der Fähigkeit reife Nachkommenviruspartikel in oder auf dem A-EK zu lokalisieren und die Grundsubstanz der A-EK zu bilden (Ichihasi u. Matsumoto, 1968).

Ishihasi et al. (1971) stellten fest, daß die A-EK erst 2-3 Stunden nach den reifen Viruspartikeln, also erst spät im Vermehrungszyklus gebildet wurden. Ihre Synthese war virusgesteuert, wobei sich ihre Regulierung von jener zur Biogenese der reifen Viruspartikel unterschied. In Gegenwart von Rifampicin war der V+ Charakter noch vorhanden, was durch den Einbau von unreifen Viruspartikeln in das A-EK bei einem V+ KuP-Virusstamm nachweisbar war. Bei einer Doppelinfektion eines V- KuP-Virusstammes und eines Rifampicin-resistenten Vac-Virusstammes ließ sich der V+ Charakter durch Komplementation transferieren: dies wies darauf hin, daß der V Charakter als Komponente der Virusmembran erworben war.

Nach Ichihasi u. Dales (1973) synthetisierten sogenannte "Translationskomplexe", bestehend aus A-EK-Bezirken und Polyribosomen an ihrer Oberfläche, zusammen Proteine, bei denen es sich wahrscheinlich um A-EK-Antigene handelte. Zwischen der Länge der größten Polyribosomen und dem Molekulargewicht der synthetisierten A-EK-Polypeptide (27 und 28 KD) bestand kein Zusammenhang, dafür ließ sich in isolierten "Translationskomplexen" die Bildung von RNA nachweisen.

Amano u. Tagaya (1981) isolierten aus KuP-Virus "Amsterdam und 53" verschiedene Virusklone, die keine A-EK bildeten (A- Klone), und die im Agar-Gel-Diffusionstest mit Serum, das gegen LS-Antigen gewonnen wurde, zwei LS-Linien präzipitierten, die bei ihren Elternviren erst nach Trypsinbehandlung zu sehen waren. Seren, die gegen LS-Antigen und gereinigte A-EK gewonnen wurden, reagierten in der Agar-Gel-Diffusion und im Immunfluoreszenztest sehr ähnlich. A- Klone haben möglicherweise die Fähigkeit verloren, LS-Antigene in den A-EK einzuschließen.

**CatP-Virus** bildet im Verlauf einer Infektion ebenfalls A- und B- EK (Martland et al., 1985).

Die **A-EK** waren im Durchschnitt 3-7 um (Gaskell et al., 1983) groß und oval geformt (Martland et al., 1983). Sie färbten sich eosinophil an (Gaskell et al., 1983; Martland et al., 1983, 1985; Webster u. Jefferies, 1983; Bennett et al., 1985) und reagierten schwach mit Feulgen- Lösung. Sie lagen im Zytoplasma von infizierten Zellen und fanden sich je nach Verlaufsform der Krankheit vor allem in den Epithelzellen von Haut, Mucosa und Haarfollikeln, Bronchien und Alveolen, Zunge und Waldeyer'schem Rachenring, aber auch in Makrophagen, Fibroblasten und Endothelzellen (Schönbauer et al., 1982; Gaskell et al., 1983; Martland et al., 1983, 1985; Webster u. Jefferies, 1983; Bennett et al., 1985).

Die basophilen **B- EK** waren seltener zu finden.

In mit **GerP-, AntP-, OkP-, CarP- und RhP-Virus** infizierten Zellen waren ebenfalls A-EK nachweisbar (Zwart et al., 1971; Marennikova et al., 1976 a, 1977, 1978 b; Schaller u. Pilaski, 1979).

**EP-Viren** bilden ebenfalls verschieden große, homogene, eosinophile A-EK (Potel et al., 1967 b; Kretzschmar u. Köther, 1972; Kubin et al., 1975), in denen sich reife Viruspartikel nachweisen ließen (Baxby u. Ghaboosi, 1977, Pilaski et al., 1982, 1985).

## 2.4. DIE KRANKHEITEN

### 2.4.1. Epizootiologie

Schon seit vielen Jahren sind Kuhpockenerkrankungen bei **Rind und Mensch** bekannt. Die Epidemiologie schien lange Zeit weitgehend geklärt zu sein. Beim Rind traten Kuhpocken überwiegend endemisch, in letzter Zeit nur noch sporadisch auf, wenn auch während der Weidezeit einmal ein größerer Tierbestand befallen werden konnte (Mayr, 1984). Als natürliches Virusreservoir galten lange Zeit klinisch inapparent erkrankte Rinder. Der Mensch infizierte sich durch direkten Kontakt mit erkrankten Rindern. Doch immer wieder wurde auch von sogenannten "mysteriösen" Kuhpockeninfektionen berichtet, bei denen keine Infektionsquelle gefunden werden konnte.

Seit 1960 mehrten sich die Berichte, nach denen an den verschiedensten Orten in West-, Nord- und Osteuropa bei unterschiedlichen Tierarten, vor allem bei Zootieren wie **Elefant, Raubkatze (Löwe, Panther, Ozelot, Jaguar, Gepard, Puma und Wildkatze), Okapi, Ameisenbär, Nashorn**, aber auch bei der **Hauskatze** bisher unbekannte Pockenerkrankungen auftraten, die beim Elefanten von einem EP-Virus bzw. vacciniavirus- oder kuhpockenvirusähnlichem Erreger, bei den übrigen Tierarten von einem KuP-Virus oder kuhpockenvirusähnlichen Erreger verursacht worden waren.

Auffallend war, daß in keinem Fall ein Zusammenhang mit Pocken bei Rindern bzw. überhaupt ein Kontakt mit Rindern festgestellt werden konnte. Elefanten, bei denen das Vac-Virus als Erreger identifiziert wurde, hatten sich anscheinend an frisch pockenvakzinierten Kindern infiziert (Kuntze et al., 1975) oder an anderen Tieren, möglicherweise Pferden angesteckt, die durch Kinder mit Vac-Virus infiziert worden waren (Mayer et al., 1972; Mayer, 1973; Kuntze u. Janetzky, 1982).

Erste Hinweise auf ein bisher unvermutetes **Reservoir** für KuP-Virus gaben die Untersuchungen von Ladnyi et al. (1975) über das Vorkommen von Pockenvirusantikörpern bei wilden Nagetieren in Turkmenistan (UdSSR). Bei 18,6 % der untersuchten Rennmäuse, bei 15,3 % der Gelbziegel und bei einigen Wildmäusen wurden Antikörper gegen Orthopockenviren nachgewiesen. Gleichzeitig gelang die Isolierung eines "GerP-Virus" aus den Nieren und der Milz einer Rennmaus und eines Ziesels. Es unterschied sich in seinen Eigenschaften nicht von einem KuP-Virus.

Marennikova et al. (1976 a, 1977, 1978 a, b) belegten, daß die Erkrankungen von Raubkatzen im Moskauer Zoo durch ein "CarP-Virus" hervorgerufen wurden, das von weißen Ratten stammte, die auf einer Tierfarm gezüchtet und im Zoo verfüttert wurden. Man vermutete, daß die Zuchtratten sich ihrerseits an Wildratten angesteckt hatten.

Ein bereits früher von Krikun (1974) aus kranken Zuchtratten isoliertes und wegen seiner Lungenbeteiligung als "pneumotropic virus of the white rats" bezeichnetes "RatP-Virus" unterschied sich in seinen biologischen und serologischen Eigenschaften nicht von GerP- und CarP-Virus.

Trotz zahlreicher und umfassender Untersuchungen blieb bei allen anderen Tierarten die Quelle der Infektion unbekannt.

Alle Nagetiere, die bisher experimentell infiziert wurden, nämlich die Wanderratte, weiße Ratte, weiße Maus, Rennmaus und das Gelbziegel sind für KuP-, EP- und kuhpockenähnliche Viren wie RatP- oder GerP-Virus empfänglich.

Deshalb nimmt man heute an, daß wildlebende Nagetiere das Virusreservoir für das Kuhpockenvirus bilden.

Die hohe Empfänglichkeit der Nagetiere für KuP-Virus, ihre weltweite Verteilung und ihre Verbindung zu anderen Tierarten unterstützen die Annahme (Marennikova et al., 1984). Das Rind infiziert sich wahrscheinlich zufällig und ist dann, wie die anderen Tierarten, Endwirt der Infektionskette (Baxby, 1977 b; Marennikova et al., 1984). Damit erklären sich auch die seit einigen Jahren vermehrt zu beobachtenden Kuhpockeninfektionen bei Hauskatzen.

Die **ÜBERTRAGUNG** des KuP-Virus erfolgt anscheinend direkt durch Kontakt oder auch indirekt über kontaminierte Gegenstände, doch existieren hierüber keine gesicherten Angaben.

Beweise dafür könnten aus erfolgreichen Kontaktübertragungsversuchen von GerP-Virus bei Babykaninchen (Marennikova et al., 1978 b) und RatP-Virus bei Ratten bzw. Mäusen (Maiboroda et al., 1980; Maiboroda, 1982) abgeleitet werden.

Über die Art der **AUSSCHIEDUNG** ist noch wenig bekannt.

Ratten schieden nach intranasaler Infizierung RatP-Virus mit dem Urin und Kot zwischen dem 11. und 35. Tag aus (Maiboroda 1982), bei Rennmäusen und Gelbziegeln fand sich GerP-Virus bis zu 3 Wochen p.inf. im Urin (Marennikova et al., 1978 b).

Als **EINTRITTSPORTE** kommen in erster Linie defekte Hautstellen in Frage. KuP-Virus kann über die Schleimhäute des Digestions- und Respirationstrakts aufgenommen werden (Mayr, 1984).

Auch die direkte Aufnahme von Virusträgern (Auffressen) ist möglich. So wiesen Marennikova et al. (1976 a, 1977, 1978 a, b) nach, daß sich Raubkatzen durch die Verfütterung von mit RatP-Virus infizierten weißen Ratten angesteckt hatten.

In Analogie zu den Entdeckungen in Rußland wird vermutet, daß sich Hauskatzen beim Fang von Nagern (Mäusen ?) infizieren.

Tiere aller Altersstufen erkranken an Kuhpocken. Während bei der natürlichen Infektion bisher keine Unterschiede zwischen jungen und alten Tieren bezüglich Virulenz und Krankheitsverlauf zu erkennen sind (Ausnahme: Rind, Okapi), sind im Experiment Jungtiere wesentlich empfindlicher für KuP-Viren als erwachsene Tiere.

So war z.B. RatP-Virus für Babymäuse und Jungtiere wesentlich virulenter als für erwachsene Mäuse (Maiboroda et al., 1980).

Bisher sind bei den meisten Tierarten nur einzelne Erkrankungsfälle bekannt, so daß epizootiologische Aussagen über **Morbidität, Mortalität und Letalität** der Erkrankung bei einer Tierart nicht gemacht werden können.

Beim Elefanten erkrankten meist indische Elefanten, seltener afrikanische Elefanten. Die Morbidität schwankte sehr, es selten, erkrankten alle Tiere des Bestandes. Die Krankheitsfälle traten meist sporadisch auf, mit langsamer Ausbreitung im Bestand. Dabei zeichnete sich eine jahreszeitlich Häufung in den kälteren Monaten des Jahres ab. Die Mortalität der Infektion war hoch.

Bei der Katze sind in England, vor allem in Süd- und Mittelengland inzwischen ca. 50 Pockenerkrankungen bekannt, zwei Fälle kamen in Schottland (Bennett et al., 1986), einer in Österreich (Schönbauer et al., 1982) und einer in den Niederlanden (Egberink et al., 1986) vor. Die Morbidität scheint niedrig zu sein, mit einer Ausnahme erkrankte lediglich eine einzige Katze pro Haushalt, obwohl die meisten Kontakt mit anderen Katzen hatten. Die Mortalität ist sehr niedrig. Die meisten Katzen lebten auf dem Lande, wenige teilweise oder ganz in der Stadt. Nie wurden

Fälle von Kuhpocken bei anderen Tieren in der Umgebung gefunden. Eine jahreszeitliche Häufung in den kälteren Monaten des Jahres war auffallend (Bennett et al., 1986).

#### 2.4.2. Klinik und Pathologie

Die Infektion mit KuP-, kuhpockenähnlichem oder EP-Virus äußert sich in verschiedenen Verlaufsformen.

Bei der Pockenerkrankung des Rindes, Riesenameisenbären, Okapis und der Hauskatze lassen sich drei Verlaufsformen unterscheiden: eine gutartige, lokale und kutane Form, bei der nur einige wenige Pockeneffloreszenzen auf Haut und Schleimhaut lokalisiert sind, eine bösartig verlaufende, generalisierte Form, die mit einer deutlichen Verschlechterung des Allgemeinbefindens und Beteiligung von inneren Organen einhergeht und eine milde, meist inapparent verlaufende, latente Form.

Bei Elefantenpocken wird ferner eine perakut verlaufende septikämisch-toxische Form beschrieben, bei der die Tiere innerhalb weniger Tage verenden.

Die russischen Autoren unterteilen die von ihnen beobachteten Pockenerkrankungen bei Raubkatzen und Nagetieren nach den Erscheinungen bei den Hauptmanifestationsorganen. Danach gibt es eine dermale oder kutane Form, die bei leichtem Krankheitsverlauf durch einzelne, lokalisierte, bei schwerem Verlauf durch zahlreiche Pockeneffloreszenzen auf der Haut und Schleimhaut gekennzeichnet ist; eine pulmonale Form, die durch eine hochgradige Dyspnoe und Bronchopneumonie charakterisiert ist; eine gemischte oder dermale-pulmonale Form, bei der i.d.R. Pockeneffloreszenzen auf der Haut und Schleimhaut stark im Vordergrund stehen, während der Atmungsapparat erst sekundär betroffen ist, und eine klinisch inapparente, latente Form.

Bei dieser unterschiedlichen Einteilung der Krankheitsformen nach Krankheitsverlauf und klinischem Erkrankungsbild entspricht

die lokale, kutane Erkrankung der dermalen Form,  
die generalisierte Erkrankung der dermalen-pulmonalen Form und  
die septikämisch-toxische Erkrankung der pulmonalen Form.

Bei der Beschreibung von "Klinik und Pathologie" ist zu berücksichtigen, daß z.B. bisher beim Riesenameisenbär, Okapi und den Raubkatzen nur Einzelerkrankungen beobachtet wurden. Genauere Berichte lagen z.T. nur aus experimentellen Versuchen wie bei den Nagetieren vor.

Bisher ist eine natürliche Infektion mit KuP- bzw. EP-Viren bei folgenden Tierarten bekannt:

Rind

Nagetiere: Ratte, große Rennmaus, Gelbziegel

Feliden: Löwe, Panther, Gepard, Ozelot, Jaguar, Puma, Bengal-, Pallas- und Hauskatze

Riesenameisenbär

Okapi

Breitmaulnashorn

Elefant

#### 2.4.2.1. Rind

Beim Rind kommt es zu einer gutartig verlaufenden, lokalen und nur selten zu einer schlimm verlaufenden Allgemeinerkrankung mit generalisiertem Exanthem (Mayr, 1984).

Die Inkubationszeit beträgt etwa 3 bis 7 Tage.

Die **lokale Form** beginnt mit mäßigem Fieber, das oft unbemerkt bleibt. Zusammen oder kurz vor der Temperaturerhöhung bilden sich am Euter, an den Zitzen oder an den Hoden, sehr selten an anderen Körperstellen wie etwa der Mundschleimhaut, kleine, eng begrenzte Erytheme, die zunächst zu Papeln, dann zu Bläschen und schließlich nach 8 bis 11 Tagen zu Pusteln mit typischen zentralen Nekrosen (Pockennabel) heranreifen, um dann mit einer dunklen, hämorrhagischen Kruste einzutrocknen. Diese Form verläuft in der Regel gutartig, wenn nicht abgerissene Pusteldecken bakteriell infiziert werden und sich Abszesse oder Geschwüre bilden.

Die seltene **generalisierte Form** ist von schweren Störungen des Allgemeinbefindens begleitet. Sie ist vor allem durch die sekundäre Vermehrung des Erregers in der Haut und Schleimhaut sowie in den inneren Organen bedingt. Oft leiden die Tiere an schweren Mastitiden und Ulzerationen.

#### 2.4.2.2. Nagetiere

Bisher infizierten sich in der freien Natur die weiße Ratte (*Rattus albus*), die große Rennmaus (*Citellus fulvus*) und das Gelbziegel (*Rhombomys opimus*) mit RatP- bzw. GerP-Virus.

Bei der Ratte konnten eine pulmonale, dermale, gemischte und inapparente abortive Form unterschieden werden. Die Form der Erkrankung ist vom Alter abhängig. Bei Rennmaus und Gelbziegel dominiert in der Natur die inapparente, im Experiment die pulmonale Form (Marennikova et al., 1976 a, b, 1978 a, b; Marennikova, 1979).

Die Inkubationszeit beträgt experimentell bei der Ratte 5 bis 7 Tage (Marennikova et al., 1978 a), für Rennmaus und Gelbziegel ist sie nicht bekannt.

Bei der **pulmonalen Form** leiden die Nager zunehmend an einer hochgradigen Dyspnoe. Einzelne Ratten zeigen ein aufgeblähtes Abdomen, viele Ziesel magern progressiv ab, Rennmäuse haben Husten und Konjunktivitis. Ratten sterben nach 3 bis 4, Rennmäuse und Ziesel nach 7 bis 12 Tagen.

Als wesentliche **pathologisch-anatomische** Veränderungen werden bei der Ratte eine Bronchopneumonie, häufig kompliziert durch eine Pleuritis mit seröser oder hämorrhagischer Exsudation, hämorrhagische Magen und Darmveränderungen, bei Rennmaus und Ziesel nekrotische Bezirke in der Lunge und bei der Rennmaus multiple Nekroseherde in der Leber registriert. Pockeneffloreszenzen fehlen auf der Haut und Schleimhaut.

Die **dermale Form** verläuft milder. Kleine, rote Papeln treten vorwiegend an haarlosen Körperstellen wie Schnauze, Schwanz und Pfoten, selten am ganzen Körper auf. Sie trocknen unter Krustenbildung rasch ein, gelegentlich entstehen an den Pfoten und am Schwanz Nekrosen, die zum Abfallen der betroffenen distalen Teile führen. Eine Rhinitis und Konjunktivitis, deren hämorrhagischer Ausfluß nach dem Eintrocknen rote Ränder um die Augen, die sogenannte "Brille" bildet, werden ebenfalls beobachtet. Selten kommt es zu Todesfällen.

**Pathologisch-anatomisch** finden sich neben den Pockenläsionen auf der Haut und Schleimhaut manchmal ein Exanthem im Maul, Nasopharynx und Rektum und eine Herdpneumonie.

Die gemischte Form vereinigt Symptome aus der pulmonalen und dermalen Form. Eine genauere Beschreibung fehlt.

Als inapparent oder abortiv werden Fälle bezeichnet, bei denen es nur zu Störungen des Allgemeinbefindens kommt. Die Tiere sind dann apathisch, nehmen kein Futter mehr auf und haben ein zerzaustes Haarkleid.

#### 2.4.2.3. Okapi (Okapi johnstoni)

Das Okapi erkrankt an einer leichten, lokalen, kutanen Form und an einer schweren generalisierten Form (Zwart et al., 1971).

Bei der lokalen, kutanen Form findet man einzelne kleine, intradermale, zunächst nur palpierbare Papeln, die sich rasch zu flachen, runden, 1,5 bis 2 cm großen Pocken entwickeln, die zunächst einen Nabel zeigen und später mit einer hellbraunen Kruste bedeckt sind. Sie verursachen Pruritus und sind i.d.R. vereinzelt auf der Haut oder Zunge lokalisiert. Nach 5 bis 6 Wochen heilen sie mit kleinen, durch Haarwirbel angedeuteten Narben ab.

Bei der generalisierten Form ist die Temperatur erhöht, die Futter- und Wasseraufnahme reduziert. Die Tiere leiden an Rhinitis. Multiple Pocken sind über den ganzen Körper verteilt, vor allem am Hals, aber auch an Augenlidern, Nüstern und der Lippe. Im Maul und auf der Zunge sind weißliche, weiche, runde, ungefähr 0,5 cm dicke, schmerzhaft Pocken zu sehen. Unter einer Verschlechterung des Allgemeinbefindens tritt der Tod ein.

Pathologisch-anatomisch sind nur die Veränderungen eines einzigen Falls bekannt: neben den Hautveränderungen fanden sich am Übergang von Retikulum zum Rumen rosarot gefärbte, 1,5 cm große, runde Läsionen. Andere pathologische Befunde waren nicht pathognomonisch (Zwart et al., 1971).

#### 2.4.2.4. Riesenameisenbär (Myrmeocophaga tridactyla)

Der Riesenameisenbär erkrankt an einer bösartigen generalisierten Form (Marennikova et al., 1976 b).

Die Krankheit beginnt mit Inappetenz und profuser Salivation. Die Tiere bekommen einen frequenten, trockenen Husten und leiden ab dem 3. Tag an einer hochgradigen Dyspnoe. Ab dem 5. oder 6. Tag findet sich Blut im Speichel. Das Allgemeinbefinden verschlechtert sich ständig, die Tiere fressen nichts mehr und werden apathisch. Sie liegen meist, bei Gehversuchen taumeln sie und stürzen.

Erst ab dem 8. bis 9. Tag bilden sich vor allem an haarlosen Hautbezirken, wie Nase, Hals, Perineum 0,5 - 1 cm große, harte Bläschen, deren Inhalt schnell hämorrhagisch wird. Sie nehmen an Zahl zu, konfluieren, vergrößern sich im Lauf der Zeit auf 1,5 - 2 cm und werden purulent-hämorrhagisch. Sie verursachen starken Juckreiz, so daß die Tiere sich ständig kratzen.

Das Allgemeinbefinden verschlechtert sich mehr und mehr, die Tiere werden kachektisch und sterben nach 3 bis 4 Wochen.

**Pathologisch-anatomisch** fanden sich in zwei bekannten Fällen neben den Hautveränderungen zahlreiche Schleimhautläsionen auf Lippen, Zunge, hartem Gaumen und Teilen des Pharynx nur unspezifische Veränderungen des Herzens, der Lunge und der Nieren (Marennikova et al., 1976 b).

#### 2.4.2.5. Raubkatzen

Löwe (*Panthera leo*), Panther (*Panthera pardus*), Gepard (*Acinonyx jubartus*), Ozelot (*Felis pardalis*), Jaguar (*Felis onca*), Puma (*Felis concolor*), Pallas- (*Felis manul*) und Bengalkatze (*Felis bengalensis*)

Die Raubkatzen erkranken an einer dermalen, pulmonalen und gemischten Verlaufsform. (Marennikova et al., 1977)

Bei der **pulmonalen Form** haben die Tiere Fieber und leiden unter Tachypnoe, paroxysmalem Husten und schließlich an einer hochgradigen Dyspnoe. Die Schleimhäute sind zyanotisch.

Nach 3 bis 8 Tagen tritt der Tod ein. Hautveränderungen sind nicht vorhanden.

**Pathologisch-anatomisch** dominiert eine fibrinös-nekrotische Bronchopneumonie mit einer sero-fibrinösen Pleuritis.

Die dermale Verlaufsform wird in eine leichte, lokalisierte und eine schwerere, generalisierte Form unterteilt. Bei der leichten Form fallen nur einzelne Hautveränderungen an Kopf, Körper und Extremitäten auf, die - zum Teil im Fell verborgen - leicht übersehen werden.

Die generalisierte Form verläuft schwerer. Multiple Pusteln konfluieren häufig und verteilen sich über den gesamten Körper. Der generalisierte Hautausschlag wird zum Teil vom Fell verborgen und ist nur durch Palpieren zu erkennen. Am Maul sind trockene Krusten zu sehen.

Die gemischte Form beginnt mit Husten und Nasenbluten. Am dritten Tag bilden sich Papeln, dann Bläschen, die sich, zunächst hauptsächlich an Kopf und Ohr lokalisiert, über den ganzen Körper ausbreiten und ab Tag 7 p.inf. auf den Schleimhäuten von Maul, Pharynx und Oesophagus erscheinen. Hinzu kommt eine Pneumonie mit Exsudation in die Pleuralhöhle.

#### 2.4.2.6. Hauskatze (Felis domesticus)

Die Pocken der Katze äußern sich meistens in einer lokalen, kutanen Form und einer selteneren generalisierten Form.

Die Erkrankung verläuft wesentlich milder als bei den ebenfalls zur Familie der Felidae zählenden Raubkatzen. Es besteht zudem die Möglichkeit, daß zahlreiche Katzen wegen "Hautveränderungen" mit Kortikosteroiden oder Megestrolazetat therapiert wurden und es deshalb zu einem erschwerten oder atypischen Verlauf kam.

Männliche und weibliche Katzen aller Altersstufen erkrankten bisher an Pocken, ein Einfluß von Alter oder Geschlecht auf den Ablauf der Krankheit war nicht zu erkennen.

Bei der lokalen kutanen Form ist über die ersten Symptome noch wenig bekannt, sie sind wenig spezifisch und werden deshalb übersehen. Gelegentlich wird eine purulente Konjunktivitis beobachtet (Gaskell et al., 1983).

Die eigentliche Erkrankung beginnt mit einzelnen, primären Hautveränderungen. Sie können am ganzen Körper vorkommen, treten aber bevorzugt am Kopf (Ober-, Unterkiefer, Nase, Augenlid, Lippe), Hals oder den Vordergliedmaßen (vor allem Pfoten) auf und finden sich öfters neben "bißähnlichen" Wunden. Das umgebende Gewebe kann stark geschwollen sein. Diese Primärläsionen sind ungefähr 0,5 bis 1

cm im Durchmesser groß und von variablem Aussehen: glänzend rote Erosionen und Plaques bis zu mit grauen Krusten bedeckten kraterförmigen Geschwüren, seltener sind Zungenulzera, Granulome auf der Lippe oder eine ausgedehnte faciale Zellulitis. Sehr oft fehlt die Primärläsion völlig oder wird übersehen.

Kommt es zur **Generalisation**, erscheinen ungefähr 4 bis 16 Tage nach dem Auftreten der primären zahlreiche sekundäre Hautveränderungen. Sie verteilen sich über den ganzen Körper und sind vor allem im Gesicht, an den Ohren, am Kopf, Hals und Rücken, seltener an den Flanken, am Abdomen und Thorax, Skrotum, in schweren Fällen jedoch sogar in der Mundhöhle lokalisiert. Ihre Zahl variiert stark, manchmal entstehen nur vereinzelte, meistens mehr als 10 Effloreszenzen. Aus den zunächst im Durchmesser 2 bis 3 mm großen, harten Knötchen oder Papeln werden nach zwei bis drei Tagen bis 2 cm große, kreisförmige Hautveränderungen: flache, rot-glänzende, feuchte, haarlose Plaques; kraterartige, eitriges Geschwüre, die von einem wallartigen Rand umgeben und mit grauen, dicken Krusten bedeckt sind oder glatte bis granuläre, rote Erosionen mit oder ohne graue Krusten. Die Haare um die Pockenläsionen werden matt und fallen schließlich aus. Die Läsionen heilen unter Krustenabfall nach 3 bis 7 Wochen mit und ohne kleine Narben ab. Ein starker Juckreiz veranlaßt die Katzen zu ständigem Kratzen, was nicht selten bakterielle Sekundärinfektionen zur Folge hat.

**Pathologisch-anatomisch** sind neben Hautveränderungen erosive, vesikuläre und ulzerierte Läsionen in der Mundhöhle und Erosionen in der Dickdarmschleimhaut zu beobachten. Histologisch bilden sich bei den frühen Hautveränderungen zentrale Vesikel, die nach einer ballonierenden und retikulären Degeneration mit anschließender Nekrose der Stachelzellen im Stratum spinosum, teilweise auch in Stratum germinativum entstehen. Später wird die Epidermis durch ein eosinophiles Koagulum aus nekrotischen Zellen und Fibrin ersetzt, in dem basophile Zelltrümmer und einige Bakterienkolonien verstreut sind. Die Epidermis am Rand kann verdickt sein, einige der angrenzenden Epidermiszellen enthalten charakteristische, ca. 3 bis 7 µm große, ovale, eosinophile, intrazytoplasmatische Einschlusskörperchen. In der Umgebung findet sich eine dichte zelluläre Infiltration, die vor allem aus Lymphozyten, Plasmazellen und einigen neutrophilen, polymorph-kernigen Leukozyten besteht. Am Rand der Krusten bilden sich schließlich wieder Epithelzellen und Narbengewebe, zusammen mit Zellinfiltraten aus vorwiegend mononukleären Zellen (Thomsett et al., 1978; Gaskell et al., 1983; Martland et al., 1983, 1985; Webster u. Jefferies, 1984).

In schweren Fällen kommt es mit dem Auftreten der Sekundärläsionen zu einer Verschlechterung des Allgemeinbefindens. Die Körpertemperatur ist stark (bis 41 °C) erhöht (Gaskell et al., 1983; Webster et Jeffries, 1984; Bennett et al., 1986),

Lymphknoten können vergrößert sein (Martland et al., 1983). Einige Katzen leiden an Konjunktivitis, Blepharitis oder Keratitis mit mucopurulentem oder purulentem Augenausfluß (Gaskell et al., 1983; Martin et al., 1984). Erbrechen (Thomsett et al., 1978), Durchfall (Gaskell et al., 1983), Ikterus (Webster et Jeffries, 1984) oder zeitweilige neurologische Symptome (Gaskell et al., 1983) signalisieren schwere Störungen der inneren Organe.

Nur wenige Katzen leiden an Rhinitis oder erkranken an einer Bronchopneumonie mit hochgradiger Dyspnoe und Tachypnoe. Eine pulmonale Form, wie sie überwiegend bei den großen Raubkatzen auftritt, scheint die Ausnahme zu sein (Thomsett et al., 1978; Schönbauer et al., 1982; Webster u. Jefferies, 1984; Martland et al., 1985).

**Pathologisch-anatomisch** wird dann eine katarrhalisch-eitrige Bronchopneumonie mit zahlreichen nekrotischen Herden im Lungengewebe, den Bronchien und der Trachea diagnostiziert (Schönbauer et al., 1982; Webster u. Jefferies, 1984), in einem Fall wird von einem Erguß von 30 ml klarer, farbloser Flüssigkeit in die Pleurahöhle berichtet (Thomsett et al., 1978).

#### 2.4.2.7. Elefant

Pockenerkrankungen sind beim Indischen Elefanten (*Elephas maximus*) und beim Afrikanischen Elefanten (*Loxodonta africana*) beschrieben.

Das klinische Bild der Elefantenpocken ist variabel. Der Afrikanische Elefant erkrankt seltener und an einer leichteren Verlaufsform als der Indische Elefant. Jungtiere erkranken besonders schwer. Die Krankheitsdauer schwankt je nach Verlaufsform zwischen einer Woche und zwei Monaten. Die Inkubationszeit schwankt zwischen 15 bis 22 Tagen.

Im **Frühstadium** sind die ersten Krankheitssymptome wenig spezifisch und werden oft übersehen. Die Temperatur ist erhöht, der Appetit herabgesetzt, Kau- und Schluckbeschwerden, verbunden mit mehr oder weniger starker Salivation und vereinzelte Stomatitiden scheinen zunächst auf einen Zahnwechsel oder eine Zahn-erkrankung zu deuten. Auffällig sind ödematöse Schwellungen am Kopf (Ober-, Unterkiefer, Orbitalbereich), Rüssel und Unterbauch. Sehr oft leiden die

Tiere an einer spontan auftretenden fieberhaften Arthritis mit Lahmheit und einer katarrhalischen Konjunktivitis, nach Gehring et al. (1978) Leitsymptom der Pokkenerkrankung.

Beim **latentem Verlauf** der Elefantenpocken scheint eine Konjunktivitis das einzige Symptom zu sein, das auf eine Erkrankung hinweist.

Bei der mild verlaufenden **kutanen Form** treten einige Tage später wenige, charakteristische Pockenveränderungen auf, die keine Konfluierungstendenz aufweisen. Das Allgemeinbefinden und der Appetit sind kaum beeinträchtigt. Die Pocken können über den ganzen Körper verteilt vorkommen, manifestieren sich aber bevorzugt am Kopf, in der Nähe benachbarter Schleimhäute (Rüsselspitze, Augenlider, Gehörgang) und an den Schleimhäuten der Maulhöhle, auf der Zunge und am Rüssel, sowie in der perivulvären und perianalen Region, der sogenannten Schwanzklappe, an Penis und Präputium und an den Extremitäten. Auf der Haut treten zunächst einzelne, linsen- bis manchmal kastaniengroße, druckempfindliche Auftreibungen oder Beulen auf, die sich zu Papeln und innerhalb weniger (3 bis 5) Tage zu fluktuierenden, oft stark erhabenen Blasen entwickeln. Die Epitheldecke reißt häufig ein und es entleert sich ein bernsteingelbes, klares, visköses, später blutig-eitriges Sekret, das dann die entstehenden schmierig-eitrigen, kraterartigen Geschwüre bedeckt. Die zentrale Delle verkrustet und langsam reepithelisiert das Geschwür vom wallartigen Rand zum Zentrum hin und heilt mit unpigmentierten, narbigen Einziehungen aus. Seltener bilden sich aus den Papeln echte Pusteln. Die Hautläsionen üben einen starken Juckreiz aus, so daß die Elefanten ständig daran scheuern und kratzen. In der dorsalen Körperhälfte - auf Rücken, Flanken und Kruppe - persistiert ein Teil (in leichteren Fällen mehr) der Läsionen wochenlang als knotige, bis fünfmarkstückgroße, rundliche, derbe, nicht schmerzhaft Erhabenheiten, die sich allmählich zurückbilden, ohne Narben zu hinterlassen.

Bei der bösartigen, **generalisierten Form** breiten sich zahlreiche Pocken über die ganze Körperoberfläche und die Schleimhäute aus. Das Allgemeinbefinden ist stark beeinträchtigt, die Futter- und Wasseraufnahme ist - je nach Lokalisation der Veränderungen reduziert oder völlig aufgehoben, die Körpertemperatur ist erhöht. In schweren Fällen finden sich Hautveränderungen auf der Mund-, Zungen-, Kehlkopf-, Ösophagus-, Lungen- und Darmschleimhaut. Diese bis fünfmarkstückgroßen, rundlichen, kraterförmigen Geschwüre sind im Zentrum mit schmierigem

Eiter bedeckt und von einem geröteten Wall umgeben, der sich ca. 1 bis 2 mm über die gesunde Schleimhaut erhebt. In den Epithel"grenzgebieten", d.h. dem Übergang von Haut zur Schleimhaut (Auge, Rüsselspitze, Lippenränder, Anal-falte) sind die Effloreszenzen dichter gesät als am Rumpf und konfluieren zu größeren, graugelben Belägen, die die Schleimhaut beetartig überragen und fest mit der Unterlage verbunden sind. Die Ränder der Geschwürsflächen sind unregelmäßig zerfranst. Während der Generalisation siedeln sich stets auch Pocken-pusteln im Hornsaum an, die konfluieren, das Nagel- und/oder Sohlenhorn unterminieren und große Nekroseherde bilden, so daß sich Zehennägel und Sohle lockern und es zum Ausschuhlen kommt. Jede Mitbeteiligung des Hufs wird als lebensbedrohlich eingeschätzt, da die entstehenden Lahmheiten oft eine Belastungsreihe, mindestens des benachbarten, meistens aber aller Hufe provozieren.

Beim in der Regel tödlich endenden **septikämisch-toxischen Verlauf** ist das Allgemeinbefinden hochgradig gestört: Ohr- und Rüsselbewegungen werden eingestellt, die Rüsselspitze wird eingerollt auf den Boden gesetzt, die Tiere sind total apathisch. Die Futteraufnahme sistiert. Die Körpertemperatur ist stark erhöht, sie fällt ante finem unter die Normalgrenze. Die Atemluft ist stinkend, der Nasenausfluß purulent. Breiige, wässrige Fäzes, die Blut und rötlich-gelb gefärbte, schleimig-eitrige Beläge, mit einem ringförmigen Wall von 1 bis 2 mm Höhe und einer zentralen kraterförmigen Einziehung und abgestoßene, ca. 3 bis 5 cm große Schleimhautboutons enthalten, lassen auf ausgedehnte, zahlreiche Erosionen und Geschwüre im gesamten Verdauungstrakt schließen. Die zahlreichen Pockeneffloreszenzen auf Haut und Schleimhäuten konfluieren zu großflächigen, landkartenähnlichen Ulzerationen, die meist sekundär bakteriell infiziert werden. Durch eine schwere, ausgedehnte Rüsselpneumonie verschlechtert sich der Zustand weiter. Riesige Ödeme am Unterbauch und an der Vulva, die sich bis auf die Extremitäten ausdehnen, führen schließlich zum Kreislaufkollaps, die Tiere verenden mit oder ohne Exungulation innerhalb von wenigen Tagen. (Potel et al., 1963; Potel, 1967 b; Kretschmar u. Köther, 1972; Mayer et al., 1972; Mayer, 1973; Kuntze, 1974; Kubin et al., 1975; Kuntze et al. 1975; Gehring und Mayer, 1978; Kuntze, 1982; Kuntze u. Janetzky, 1982; Pilaski et al., 1983, 1984, 1985)

**Labordiagnostisch** findet sich während der Inkubationszeit und in den ersten Tagen nach dem Auftreten der primären Effloreszenzen eine starke Leukopenie. Im Differentialblutbild sind eine Lymphopenie und leichte Linksverschiebung mit dem Auftreten jugendlicher und stabkerniger Neutrophiler zu sehen, selten eine absolute Eosinopenie. Parallel zur Besserung der klinischen Symptome normali-

sieren sich Differentialblutbild und Leukozytenzahl, das Rekonvaleszenzstadium ist von einer Leukozytose ohne Eosinophilie begleitet. Erhöhte GOT-Werte weisen auf eine Mitbeteiligung des Leberstoffwechsels hin (Kuntze, 1982).

**Pathologisch-anatomisch** finden sich neben den äußerlich sichtbaren Veränderungen im Rüssel, in den Nasengängen des Rüssels, in der gesamten Maulhöhle, auf der Zunge, am Kehlkopf, im Ösophagus und am Mageneingang zahlreiche Epitheldefekte, Erosionen oder kraterförmige Ulzera, die sich teilweise zu umfangreichen nekrotischen Bezirken vereinigen (Potel et al., 1963 b; Kretzschmar u. Köther, 1972; Mayer et al., 1973). In der Dickdarmschleimhaut sind Boutons zu sehen, die Serosa und das Mesenterium ist mit massiven, teils streifigen Blutungen durchsetzt (Kretzschmar u. Köther, 1972), Erosionen und Geschwüre sind auch an der kutanen Schleimhaut des Geschlechtsapparates zu sehen (Potel et al., 1963). Spezifische Veränderungen wurden auch in der Lunge, unter der Serosa der Leber und Milz sowie am viszeralen Blatt des Perikards und am Epikard beschrieben (Mayer et al., 1973).

### 2.4.3. Immunität

Die Pockenimmunität ist zellulär und humoral verankert. Sie entwickelt sich stufenweise. Zuerst bildet sich die zelluläre Immunität (sogenannte delayed hypersensitivity) aus, 1-2 Tage später erscheinen die ersten Antikörper.

Das KuP-Virus löst im infizierten Säugetierorganismus die Bildung von hämagglutinationshemmenden (HAH-), virusneutralisierenden (N-) und präzipitierenden (P-) Antikörpern aus.

Beim **Rind** traten nach kutaner Impfung N-AK und P-AK etwa am 10., HAH-AK erstmals am 12. Tag p.inf. auf, bei kutaner massiver Flächenimpfung waren die AK-Titer 2-3 Tage früher nachweisbar.

Baxby (1979) stellte nach natürlichen Kuhpockeninfektionen beim Rind N-AK noch nach zwei Jahren fest. Die anfänglich hohen N-Titer waren zu niedrigsten Titern abgefallen, wobei starke individuelle Schwankungen zu verzeichnen waren. Alle erkrankten Tiere wiesen ebenfalls sehr niedrige HAH-Titer auf, die nach 66 Wochen nicht mehr zu messen waren. P-AK waren nicht nachweisbar. Nur bei klinisch erkrankten Tieren wurden Antikörper festgestellt, vermutlich kam es zu keinen subklinischen Infektionen.

Beim **Elefanten** fanden Kuntze und Niemer (1974) bei KB-AK und HAH-AK einen charakteristischen Verlauf, wobei allerdings zwischen dem Krankheitsbild und der Höhe der AK-Titer kein Zusammenhang bestand. KB-AK erreichten ihren höchsten Titer nach 19 Tagen, die HAH-AK-Titer hatten ihr Maximum erst am 25 Tag p.inf.. Beide AK-Arten waren 21 Monate p.inf. nicht mehr bei allen erkrankten Tieren meßbar, N-AK konnten dagegen weiterhin bei allen Tieren nachgewiesen werden.

Bei experimentell mit GerP-Virus infizierten **Rennmäusen und Gelbzieseln** traten 10 Tage p.inf. HAH- und N-AK auf, sie erreichten ihr Maximum 3 Wochen p.inf., um dann nach weiteren 3 Wochen stark abzufallen. P-AK traten ebenfalls auf (Marennikova et al., 1978 b).

RatP- und KuP-Virus induzierten bei **Mäusen** einen weitaus niedrigeren AK-Titer als Vac- und MP-Virus (Marennikova et al., 1978 a).

Natürlich erkrankte **Geparden** besaßen bereits am 4. Tag HAH-AK, deren Titer rasch anstieg und hohe Werte erreichte. Äquivalent verhielten sich die N-AK.

Bennett et al. (1985) wiesen bei 17 natürlich erkrankten **Katzen** HAH- und N-AK eine Woche nach dem Auftreten erster Symptome und dann über 6 Monate lang nach.

Gaskell et al. (1983) fanden bei experimentell infizierten Katzen 13 bis 16 Tage nach intravenöser oder kutaner Infektion mit CaP-Virus hohe HAH-Titer und niedrige N-Titer.

Nach Baxby (1982), Bennett et al. (1985) und Gaskell et al. (1983) wiesen Katzen in der frühen akuten Infektionsphase hohe HAH-Titer und niedrige oder negative N-Titer auf, die nach Meinung von Bennett bei der Diagnostik zu falschen Schlußfolgerungen Anlaß geben könnten.

Martland et al. (1985) hingegen fanden bei einer natürlich erkrankten Katze relativ hohe N-Titer.

#### 2.4.4. Diagnose

Bei allen Tierarten läßt sich aufgrund des Vorberichts und des klinischen Bildes nur die Verdachtsdiagnose "Kuhpocken" bzw. "Elefantenpocken" stellen. Eine endgültige Diagnose ist nur experimentell durch Isolierung und Charakterisierung des Erregers möglich.

Für die rasche Diagnose empfiehlt sich eine elektronenmikroskopische Untersuchung der Krusten und Bläschenflüssigkeit oder von Biopsiematerial, bei der die charakteristische quaderförmige Gestalt des Virus einen ersten Hinweis auf "Orthopockenvirus" gibt.

Für die genauere Differenzierung stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung: Vermehrung des Virus in Versuchstieren, im bebrüteten Hühnerei, auf Zellkulturen, sowie histopathologische und serologische Untersuchungen.

Nach Herrlich (1967) sollten die Ergebnisse mehrerer Untersuchungsverfahren vergleichend ausgewertet werden, weil bestimmte KuP-Virusstämme in ihrem Verhalten weitgehend manchen Vac-Virusstämmen ähneln.

Baxby (1975) empfahl für KuP-Virus den Nachweis auf der CAM kombiniert mit dem Nachweis von zytoplasmatischen Einschlußkörperchen.

Ein Virus, das auf der CAM hämorrhagische Pocken bei einer Grenztemperatur nicht über 40 °C bildet und zytoplasmatische EK vom Typ A hervorruft, muß als KuP-Virus betrachtet werden.

EP-Virus läßt sich anhand der zytoplasmatischen A- EK und mit Hilfe von Kreuzneutralisationsuntersuchungen mit absorbierten Seren nachweisen (Tripathy et al., 1981).

### 2.4.5. Differentialdiagnose

Differentdiagnostisch sind bei allen Tierarten vor allem Krankheiten auszu-schließen, die mit Haut- und Schleimhautveränderungen bzw. mit einer Beteili-gung der Atmungsorgane einhergehen.

Einen zusammenfassenden Überblick über mögliche Differentialdiagnosen gibt Tabelle 1:

| I Infektiöse Erkrankungen                           |                                                                                                                                                                                                               |
|-----------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. Virale Erkrankungen                              |                                                                                                                                                                                                               |
| Rind                                                | Vaccinia-Virusinfektion<br>Pseudokuhpocken<br>Euterpocken<br>Stomatitis papulosa<br>bovine Herpes-Virus-Mammillitis<br>bovine Papillomatose<br><br>Maul- und Klauenseuche<br>Rinderpest<br>Lumpy Skin Disease |
| Elefant                                             | Maul- und Klauenseuche                                                                                                                                                                                        |
| Feliden                                             | feline Herpes-Virusinfektion<br>Calici-Virusinfektion                                                                                                                                                         |
| 2. Bakterielle Erkrankungen                         |                                                                                                                                                                                                               |
| 3. Mykosen                                          |                                                                                                                                                                                                               |
| 4. Parasitosen                                      |                                                                                                                                                                                                               |
| II Nicht infektiöse Erkrankungen                    |                                                                                                                                                                                                               |
| 1. Traumatische Erkrankungen                        |                                                                                                                                                                                                               |
| 2. Physikalisch oder chemisch bedingte Erkrankungen |                                                                                                                                                                                                               |
| 3. Allergische Erkrankungen                         |                                                                                                                                                                                                               |
| 4. Erkrankungen unbekannter Ätiologie               |                                                                                                                                                                                                               |

#### 2.4.6. Therapie und Prophylaxe

Es gibt keine spezifische **Therapie** gegen Kuh- und Elefantenpocken. In schweren Fällen kann versucht werden, die Krankheitserscheinungen durch eine symptomatische Therapie zu mildern. Medikamente mit immunsuppressiven Nebenwirkungen, sind kontraindiziert.

Eine **Prophylaxe** ist durch Schutzimpfung mit attenuiertem Vac-Virus möglich, wie z.B. mit dem attenuierten Vac-Virusstamm "MVA". Mayr et al. (1984) empfehlen für die Tierimpfung die parenterale Applikation von Vac-Virus "MVA", die Impfdosis sollte dabei einen Virusgehalt von ca.  $10^8$  KID<sub>50</sub> enthalten.

So ließen sich beim Elefanten gute Erfolge erzielen, wenn Vac-Virus "MVA" subkutan mit einer Dosis von  $10^8$  KID<sub>50</sub> am Ohrgrund verimpft wurde. Nach wenigen Tagen trat dann der Impfschutz ein. Gehring u. Mayer (1978) rieten zur raschen Durchführung einer Notimpfung, wenn es im Bestand zu einem Pockenausbruch gekommen war oder der Verdacht auf Elefantenpocken bestand.

#### 2.4.7. Kuh-und Elefantenpocken beim Menschen

Der Mensch ist sowohl für KuP- wie auch für EP-Virus empfänglich.

Kuhpocken sind heute nur noch eine sporadisch bzw. endemisch auftretende Erkrankung beim Rind und anderen Tierarten und damit auch beim Menschen selten geworden. Baxby (1977) entdeckte in England von 1965-1976 nur 10 Kuhpockeninfektionen beim Menschen.

Einen Überblick über die Kuhpockeninfektionen in jüngster Zeit gibt Tabelle 2.

Früher waren Kuhpocken eine typische Berufskrankheit. Das KuP-Virus wurde von infizierten Rindern auf den Menschen übertragen, es erkrankten gewöhnlich Melker und andere Personen, die mit den Eutern und Zitzen infizierter Kühe in Kontakt kamen. Heute kann bei den meisten Erkrankungen kein Kontakt zu Rindern mehr nachgewiesen werden. Oft erkranken Kinder bzw. Jugendliche.

Die Inkubationszeit der Kuhpockenvirusinfektion des Menschen beträgt 2-6 Tage. In dieser Zeit entwickeln sich eine oder mehrere Pockeneffloreszenzen vor allem an den Händen, besonders am Daumen, an der ersten Interdigitalspalte und am Zeigefinger, an der Hand, am Unterarm oder im Gesicht. Es bilden sich papulovesikuläre oder granulomatöse, nicht schmerzhaft Pockenläsionen: bis zu etwa 1 cm große Bläschen oder rötlich-violette, hirsekorn- bis bohnen große Knötchen, die oft mit einem starken lokalen Ödem, axillärer Lymphadenitis und Lymphangitis und einem mehrtägigem Fieber einhergehen können. Die Veränderungen heilen innerhalb weniger Wochen ab, wenn nicht Komplikationen durch Sekundärinfektionen auftreten. (Dekking, 1964; Downie, 1965; Krauss und Weber, 1986).

Selten treten schwere Verlaufsfälle mit schwerer Konjunktivitis und Meningoenzephalitis auf, die dann tödlich sein können. (Dosch und Moritsch, 1956; Baxby, 1977; Krauss und Weber, 1986).

**Differentialdiagnostisch** sind die Kuhpocken von folgenden anderen Pockenerkrankungen, die vom Tier auf den Menschen übertragen werden, zu unterscheiden:

- einer Vacciniainfektion (Vacciniavirus),
- einer Stomatitis papulosa-Infektion (Parapoxvirus bovis 1)
- einer Melkerknoten-Infektion (Parapoxvirus bovis 2) oder
- einer Orf-Infektion (Parapoxvirus ovis)

| Ort      | Zeitpunkt | Fälle | Symptome                                                                      | Infektionsquelle   | Virus               | Literatur                                    |
|----------|-----------|-------|-------------------------------------------------------------------------------|--------------------|---------------------|----------------------------------------------|
| England  | 1965-1976 | 10    | lokale Pockenläsionen an Hand, Arm und Gesicht<br>system. Allgemeinerkrankung | Rind und unbekannt | KuP-Virus           | Baxby (1977)                                 |
| Leipzig  | 1960      | 5     | lokale Pockenläsionen<br>Konjunktivitis                                       | Elefant            | Pockenvirus         | Potel et al. (1963)<br>Hass (1963)           |
| Berlin   | 1960      | 2     | lokale Pockenläsion an der Lippe                                              | Elefant            | Pockenvirus         | Dathe (1963)                                 |
| Augsburg | 1971      | 2     | lokale Pockenläsion an der Hand, Unterarm                                     | Elefant            | Vac-Virus           | Gehring et al. (1972)<br>Mayer et al. (1972) |
| Moskau   | 1973      | 1     | Pockenläsionen an Hand, Arm, Knie, Gesicht                                    | Raubkatzen         | KuP-ähnliches Virus | Marrenikova et al. 1977                      |
| England  | 1985      | 1     | lokale Pockenläsion an der Hand, Fieber                                       | Katze              | KuP-Virus           | Willemse u Egberink (1985)                   |
| BRD      | 1985      | 1     | lokale Pockenläsion an der Hand                                               | ?                  | KuP-Virus           | Nasemann et al. (1987)                       |

Tabelle 2 Übersicht über Kuh- und Elefantenpockenvirus-Infektionen beim Menschen in letzter Zeit

#### 2.4.8. Der Kuhpockenvirusstamm "OPV 85"

Im Februar 1985 wurde erstmals nach Jahrzehnten wieder in der Bundesrepublik Deutschland ein KuP-Virus isoliert.

Ein 6jähriges, nicht gegen Pocken geimpftes Mädchen erkrankte mit Lymphangitis und einer proliferativen Hautveränderung zwischen dem Daumen und Zeigefinger. Später entwickelte sich eine Ulzeration mit einer hämorrhagischen, zentralen Einschmelzung (Pockennabel), die nach lokaler Therapie abheilte (Nasemann et al., 1987).

Die Ansteckungsquelle konnte nicht ermittelt werden. Das erkrankte Mädchen hatte intensiven Kontakt mit Katzen, Meerschweinchen, Stall- und Zwergkaninchen. Untersuchungen auf Antikörper gegen Orthopockenviren verliefen bei den Tieren negativ.

Mahnel (1986) charakterisierte den Erreger auf Grund seiner morphologischen, biologischen und serologischen Eigenschaften als ein KuP-Virus und nannte es Isolat "OPV 85".

Der KuP-Virusstamm "OPV 85" war im Elektronenmikroskop ca. 310x250 nm groß und quaderförmig. Histologisch ließen sich in infizierten Zellen intrazytoplasmatische Einschlußkörperchen vom Typ A mit amorpher Innenstruktur und marginal gelagerten Virionen nachweisen. KuP-Virus "OPV 85" vermehrte sich gut mit einem rasch einsetzenden cpE in Hühnerembryofibroblasten, embryonalen Rinderlungen-(BEL), Vero- und HeLa-Zellen. Die Grenztemperatur für die Virusvermehrung lag in infizierten BEL-Kulturen bei 38,5 °C. Auf der CAM bildete "OPV 85" relativ kleine, leicht proliferative, zentral stark hämorrhagische Primärherde, die ab dem 4. Tag p.inf. generalisierten. Beim Kaninchen führte "OPV 85" nach kutaner und intrakutaner Infektion zu schweren, hämorrhagischen Gewebseinschmelzungen in den Pockenläsionen und zur Generalisierung mit einem stark protrahierten Verlauf. Am Küken haftete "OPV 85" nicht. Bei der Hemmagglutinationshemmung und Serumneutralisation war "OPV 85" eng mit KuP-Virus verwandt (Mahnel, 1986).

Rösen et al. (1987) identifizierten den Erreger ("H-CP-LSax" genannt) als mögliche Elefantenpockenvirus-Variante.

Die DNS von "OPV 85" wies in der Restriktionsenzymanalyse ähnliche Spaltungsmuster wie ein EP-Virus auf, wenn bestimmte Restriktionsenzyme (SmaI, Hind III) verwendet wurden (Rösen et al., 1987).

In unseren Untersuchungen verwendeten wir diesen Kuhpockenvirusstamm "OPV 85", um die Schutzwirkung einer Impfung mit Vac-Virus "MVA" gegen eine Infektion mit KuP-Virus zu prüfen.

## Eigene Untersuchungen

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Virusstämme

##### 3.1.1. Impfstoff: Vaccinia-Virus "MVA"

Als Impfstoff wurde der in Ampullen abgefüllte, gefriergetrocknete **modifizierte Vaccinia-Virus-Stamm "MVA"**, Charge II/85 \*\* verwendet.

Dieser Stamm geht auf den Dermovaccinia-Stamm "Ankara" zurück, der durch 574 kontinuierliche Passagen in primären Hühnerembryofibroblasten-Kulturen attenuiert und über Plaque-Passagen selektiert und klonisiert wurde (Mayr et al., 1975, 1978; Mayr, 1976).

Vor Gebrauch wurde der Impfstoff in 1 ml steriler PBS-Lösung/Ampulle gelöst. Der Titer betrug  $10^7$  KID<sub>50</sub>/ml.

##### 3.1.2. Virusstamm für die Belastungsinfektion: Kuhpocken-Virus "OPV 85"

Für die Belastungsinfektion (Challenge) verwendeten wir den **Kuhpocken-Virus-Stamm "OPV 85"**. \*\*

Er wurde von Nasemann et al. (1987) aus den Pockenläsionen eines Mädchens isoliert.

Ausgangsmaterial für die Züchtung in Vero- und RK 13-Zellkulturen war die 2. CAM-Passage.

Für die Belastungsinfektion wurde KuP-Virus "OPV 85" der 1. Vero-Passage mit einem Titer von  $10^{6,5}$  KID<sub>50</sub>/ml verwendet.

\*\* Für die Überlassung danken wir Prof. Dr. Dr. h.c. mult. A. Mayr, Institut für Med. Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin der Tierärztlichen Fakultät der Universität München.

### 3.2. Zellkulturen

#### 3.2.1. Verozellen

Für die Anzucht von Verozellen verwendeten wir Hepes-gepuffertes Medium M 199 mit 10 % FKS und 1 % Amphoterin in Plastikgewebekulturschalen (Nunc, Roskilde, Dänemark). Nach 2-3 Tagen bildeten die Zellen bei 37 °C einen dichten Rasen, sie bekamen dann MEM mit 2 % FKS und 1% Amphoterin als Erhaltungsmedium. Zur Subkultivierung wurden sie mit phosphatgepufferter Trypsin-Versen-Lösung abgelöst und im Verhältnis 1:5 im Anzuchtmedium resuspendiert.

#### 3.2.2. Kaninchennierenzellen (RK 13-Zellen)

Die Vermehrung des KuP-Virus "OPV 85" erfolgte in RK 13-Zellen bei 37 °C. Als Anzuchtmedium diente Hepes-gepuffertes Medium 199 mit 10 % FKS und 1 % Amphoterin, als Erhaltungsmedium wurde das gleiche Medium verwendet. Die Subkultivierung erfolgte im Verhältnis 1:3 oder 1:4.

#### 3.2.3. Hühnerembryofibroblasten (HEF)

Vac-Virus "MVA" wurde in primären HEF-Kulturen bei 37 °C gezüchtet, die nach dem Verfahren von Mayr und Kalcher (1960) aus 10-11 Tage alten Hühnerembryonen gewonnen und mit 500.000 Zellen/ml Medium in Gewebekulturschalen (Nunc, Roskilde, Dänemark) ausgesät worden waren. Als Anzuchtmedium diente MEM mit 10 % FKS, Laktalbumin-Lösung 10 %ig, 1 % Natriumbikarbonat und Antibiotika, als Erhaltungsmedium sterile filtrierte Rinderamnionflüssigkeit ohne Zusätze.

### 3.3. Virusvermehrung in der Zellkultur

Dicht gewachsene Vero- bzw. RK 13-Zellkulturen wurden mit KuP-Virus "OPV 85" infiziert (s. Mayr et al., 1974). Nach 72stündiger Bebrütung, wurden, wenn ca. 70-90 % des Zellrasens durch einen spezifischen cpE zerstört waren, das virushaltige Erhaltungsmedium und die Zellen durch Gefriertauen geerntet. Anschließend wurden die Virussuspensionen durch 10 minütiges Abzentrifugieren bei 1000 g partiell gereinigt, portioniert und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

Die Züchtung von Vac-Virus "MVA", das als Virusantigen im ELISA benützt wurde, ist bei 3.8.2.4. beschrieben.

### 3.4. Virustitration in Zellkulturen

Der Gehalt an infektiösem Virus in den Viruspassagen bestimmten wir durch Titrierung in 24-Napf-Platten (Nunc, Roskilde, Dänemark) auf den selben Zellarten, die auch zur Vermehrung der einzelnen Virusstämme gedient hatten.

Jede Virussuspension wurde in 10er-Potenzen mit Wachstumsmedium der verwendeten Zellart verdünnt und je 1 ml davon zusammen mit 0,5 ml Zellsuspension (in der 3-fachen als zur Subkultivierung üblichen Konzentration) in 4 Näpfe pro Verdünnungsstufe gegeben. Nach 5-7tägiger Bebrütung bei 37 °C im CO<sub>2</sub>-Brutschrank erfolgte die Endablesung anhand des cpE, die Virustiter wurden nach der Methode von Kärber (1931) in KID<sub>50</sub>/ml berechnet.

### 3.5. Versuchstiere

Für die Untersuchungen standen insgesamt 20 Kaninchen zur Verfügung: 5 männliche und 15 weibliche Kaninchen der Rasse "Weiße Deutsche Riesen". Sie waren ca. 4 Monate alt, 2,5 - 3 kg schwer und stammten alle aus der gleichen Zucht (Interfauna, Süddeutsche Versuchstierfarm, Tuttlingen).

Während der Versuche wurden sie in einem Isolierstall in Metalleinzelkäfigen gehalten. Sie erhielten Alleinfutterpellets (Fa. Altromin, Lage/Lippe) und Wasser ad libitum.

### 3.6. Durchführung der Impfungen mit Vac-Virus "MVA"

Für alle Impfungen kam **Vac-Virus "MVA"** ( $10^7$  KID<sub>50</sub>/ml) als Impfstoff zur Anwendung.

Im **VORVERSUCH** immunisierten wir ein Kaninchen zweimal im Abstand von 26 Tagen intramuskulär mit je  $0,5 \times 10^7$  KID<sub>50</sub> Vac-Virus "MVA", 2 Tiere blieben ungeimpft.

Im **HAUPTVERSUCH** wurden insgesamt wurden 15 Kaninchen immunisiert, 2 Kaninchen (Kontrolltiere) blieben ungeimpft.

Die Wirksamkeit einer Vakzinierung mit Vac-Virus "MVA" sollte in Abhängigkeit

1. von der Zahl der Impfungen (ein- oder zweimalige Impfung)
2. von der Applikationsart (subkutan oder intramuskulär)
3. von der Impfdosis ( $0,5 \times 10^7$  oder  $1,0 \times 10^7$  KID<sub>50</sub>/Tier)

untersucht werden. Deshalb teilten wir die Kaninchen in verschiedene Gruppen ein, die sich in mindestens einem Parameter unterschieden.

Das Schema aller Immunisierungen mit Vac-Virus "MVA" im Hauptversuch ist in Tabelle 4 dargestellt.

#### Zahl der Impfungen

4 Kaninchen (Gruppe 1 und 2) wurden nur **einmal** geimpft (Einfachimmunisierung). 12 Kaninchen (Gruppe 3, 4, 5 und 6) wurden **zweimal** immunisiert (eine Grundimmunisierung, eine Wiederimmunisierung mit der gleichen Dosis, 26 Tage nach der Erstimpfung).

#### Applikationsart

8 Kaninchen (Gruppe 1, 3 und 5) wurde Vac-Virus "MVA" **subkutan** an der seitlichen Brustwand oberhalb des Schultergelenks und 8 Kaninchen (Gruppe 2, 4 und 6) **intramuskulär** in die Oberschenkelmuskulatur verimpft.

#### Impfdosis

5 Kaninchen (Gruppe 3 und 4) bekamen eine Dosis von  $0,5 \times 10^7$  KID<sub>50</sub>/Tier, 10 Kaninchen (Gruppe 1, 2, 5 und 6) eine Dosis von  $1,0 \times 10^7$  KID<sub>50</sub>/Tier verabreicht.

### **3.7. Untersuchungen über die Unschädlichkeit des Impfstoffes**

Das Allgemeinbefinden der Kaninchen wurde ständig kontrolliert. Nach der Impfstoffapplikation erfolgte eine regelmäßige Inspektion der Injektionsstellen auf lokale Reaktionen.

### **3.8. Untersuchungen über die Wirksamkeit des Impfstoffes**

Die Wirksamkeit des Impfstoffes Vac-Virus "MVA" testeten wir in einer Belastungsinfektion mit KuP-Virus "OPV 85". Die Antikörperbildung wurde mit Hilfe von serologischen Methoden nachgewiesen.

### 3.8.1. Durchführung der Belastungsinfektion mit KuP-Virus "OPV 85"

Die Belastungsinfektion wurde zum Nachweis des Impferfolges bei immunisierten und zur Kontrolle bei nicht geimpften Tieren mit einer definierten Dosis KuP-Virus "OPV 85" kutan und intrakutan durchgeführt.

**Vorbereitung der Tiere** für die kutane und intrakutane Infektion mit KuP-Virus "OPV 85":

Einen Tag vor der Test- bzw. Belastungsinfektion wurden die Haare der Kaninchen am Rücken und am lateralen Bauch mit der Schermaschine geschnitten, anschließend die restlichen Haare mit einer Enthaarungscreme (Depilan<sup>R</sup>) entfernt und die Haut gründlich mit Wasser gereinigt.

Die kutane und intrakutane Infektion erfolgte in Narkose. Jedes Tier erhielt intramuskulär 0,25 ml Rompun/kg KG und 0,25 ml Ketamin/kg KG.

**Technik** der kutanen und intrakutanen Infektion mit KuP-Virus "OPV 85":

Bei der **kutanen Infektion** nach der Methode von Herzberg (1955) wurden auf der enthaarten Haut mit einer Impflanzette 2 (Hauptversuch) bzw. 3 Felder (Vorversuch) mit einer Fläche von ca. 3,5x3,5 cm skarifiziert, ohne daß es zu Blutungen kam. Auf die skarifizierten Quadrate wurden jeweils 0,05 ml KuP-Virus "OPV 85" in unterschiedlicher Dosierung mit einer Mikropipette aufgetragen und eingerieben.

Bei der **intrakutanen Infizierung** nach der Methode von Groth (1921) wurde in die enthaarte Haut der anderen Bauchseite 2- (Hauptversuch) bzw. 3- (Vorversuch) mal je 0,01 ml KuP-Virus "OPV 85" unterschiedlicher Dosierung intrakutan mit einer Tuberkulinspritze im Abstand von 3-5 cm so zwischen Epidermis und Korium injiziert, daß im Durchmesser ca. 1 cm große, deutliche Quaddeln entstanden, die sich nach mehreren Stunden wieder zurückbildeten.

Bei einer Einfachimpfung erfolgte die Belastungsinfektion mit KuP-Virus "OPV 85" 40 Tage p.vacc., bei einer Zweifachimmunisierung 40 Tage nach der Erst- bzw. 14 Tage nach der Revakzinierung.

Nach der Challenge-Infektion nahmen wir bei jedem Kaninchen täglich eine allgemeine (Futter- und Wasseraufnahme, Verhalten, Temperatur) und eine spezielle klinische Untersuchung vor. Besonders wurde auf lokale Veränderungen an den kutanen Skarifikationsfeldern und den intrakutanen Injektionsstellen sowie auf eine mögliche Generalisierung mit Sekundärpocken auf der Haut und den Schleimhäuten von Nase, Maul, Vulva und Skrotum geachtet.

#### 3.8.1.1. Dosis der Belastungsinfektion

In **Vorversuchen** wurde ein nicht immunisiertes Kaninchen kutan und intrakutan mit 30.000, 3.000 und 300 KID<sub>50</sub> KuP-Virus "OPV 85" belastet.

An einem vakzinierten Kaninchen (zweimalige, intramuskuläre Immunisierung von Vac-Virus "MVA" mit einer Dosis von je  $0,5 \times 10^7$  KID<sub>50</sub>, im Abstand von 26 Tagen) und zur Kontrolle an einem ungeimpften Tier erprobten wir 7 Tage nach der Zweitimmunisierung eine Infektion mit 3.000 und 300 KID<sub>50</sub> KuP-Virus "OPV 85".

Ausgehend vom Ergebnis des Vorversuchs verwendeten wir für den **Hauptversuch** sowohl für die kutane als auch für die intrakutane Belastungsinfektion mit KuP-Virus "OPV 85" eine Dosis von 3.000 und 300 KID<sub>50</sub>.

Das Schema der Belastungsinfektionen mit KuP-Virus "OPV 85" im Vor- und Hauptversuch ist in Tabelle 3 zusammengefaßt.

Einen Überblick über den Impfmodus der Immunisierung mit Vac-Virus "MVA" und die Belastungsinfektion mit KuP-Virus "OPV 85" gibt Tabelle 4.

**Vorversuch**

| Tier<br>Zahl | Immunisierung mit<br>Vac-Virus "MVA"                                       | Belastungsinfektion mit<br>KuP-Virus "OPV 85" |                            |
|--------------|----------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|----------------------------|
|              |                                                                            | Applikations-<br>art                          | Dosis in KID <sub>50</sub> |
| 1            | ungeimpft                                                                  | kutan                                         | 30.000                     |
|              |                                                                            |                                               | 3.000                      |
|              |                                                                            | intrakutan                                    | 300                        |
|              |                                                                            |                                               | 30.000                     |
| 1            | zweimal<br>i.m. mit je<br>0,5x10 <sup>7</sup> KID <sub>50</sub><br>geimpft | kutan                                         | 3.000                      |
|              |                                                                            |                                               | 300                        |
|              |                                                                            | intrakutan                                    | 3.000                      |
|              |                                                                            |                                               | 300                        |
| 1            | ungeimpft                                                                  | kutan                                         | 3.000                      |
|              |                                                                            |                                               | 300                        |
|              |                                                                            | intrakutan                                    | 3.000                      |
|              |                                                                            |                                               | 300                        |

**Hauptversuch**

|    |                       |            |       |
|----|-----------------------|------------|-------|
| 15 | Impfmodus<br>s. Tab 4 | kutan      | 3.000 |
|    |                       |            | 300   |
|    |                       | intrakutan | 3.000 |
|    |                       |            | 300   |
| 2  | ungeimpft             | kutan      | 3.000 |
|    |                       |            | 300   |
|    |                       | intrakutan | 3.000 |
|    |                       |            | 300   |

Tabelle 3: Schema der Belastungsinfektion im Vor- und Hauptversuch

| Immunisierung<br>mit<br>Vac-Virus "MVA" |          |                       |                                        |                      | Belastungsinfektion<br>mit<br>KuP-Virus "OPV 85"        |
|-----------------------------------------|----------|-----------------------|----------------------------------------|----------------------|---------------------------------------------------------|
| Gruppe                                  | Tier-Nr. | Zahl der<br>Impfungen | Impf-<br>dosis<br>in KID <sub>50</sub> | Applika-<br>tionsart | Modus/<br>Dosis<br>in KID <sub>50</sub>                 |
| 1                                       | 181      | einmal                | $1,0 \times 10^7$                      | subkutan             | kutan:<br>3000<br>300<br><br>intrakutan:<br>3000<br>300 |
|                                         | 182      | einmal                | $1,0 \times 10^7$                      | subkutan             |                                                         |
| 2                                       | 101      | einmal                | $1,0 \times 10^7$                      | intramusk.           |                                                         |
|                                         | 190      | einmal                | $1,0 \times 10^7$                      | intramusk.           |                                                         |
| 3                                       | 183      | zweimal               | $0,5 \times 10^7$                      | subkutan             |                                                         |
|                                         | 184      | zweimal               | $0,5 \times 10^7$                      | subkutan             |                                                         |
|                                         | 187      | zweimal               | $0,5 \times 10^7$                      | subkutan             |                                                         |
| 4                                       | 192      | zweimal               | $0,5 \times 10^7$                      | intramusk.           |                                                         |
|                                         | 193      | zweimal               | $0,5 \times 10^7$                      | intramusk.           |                                                         |
| 5                                       | 186      | zweimal               | $1,0 \times 10^7$                      | subkutan             | intrakutan:<br>3000<br>300                              |
|                                         | 188      | zweimal               | $1,0 \times 10^7$                      | subkutan             |                                                         |
|                                         | 103      | zweimal               | $1,0 \times 10^7$                      | subkutan             |                                                         |
| 6                                       | 194      | zweimal               | $1,0 \times 10^7$                      | intramusk.           |                                                         |
|                                         | 195      | zweimal               | $1,0 \times 10^7$                      | intramusk.           |                                                         |
|                                         | 120      | zweimal               | $1,0 \times 10^7$                      | intramusk.           |                                                         |
| 7                                       | 189      | -                     | -                                      | -                    |                                                         |
|                                         | 000      | -                     | -                                      | -                    |                                                         |

Tabelle 4: Schema der Impfungen mit Vac-Virus "MVA" und der Belastungsinfektion mit KuP-Virus "OPV 85" im Hauptversuchversuch

### 3.8.2. Serologische Untersuchungen

#### 3.8.2.1. Serumgewinnung

Die Blutentnahme erfolgte aus der Ohrvene/-arterie vor Beginn des Versuchs (Negativserum), bei nur einmal immunisierten Kaninchen 26 und 40 Tage nach der Einfachimpfung, bei zweimal vakzinieren Kaninchen 26 Tage nach der Grund- und 14 Tage nach der Boosterimpfung und bei allen Kaninchen noch einmal 14 Tage nach der Belastungsinfektion.

Nach der Entnahme wurde das Blut über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt und am nächsten Tag bei ca. 2200 g 10 min lang zentrifugiert. Das gewonnene Serum wurde portionsweise bei -20 °C bis zur Durchführung der Antikörperbestimmung eingefroren.

#### 3.8.2.2. Hämagglutinationshemmungstest (HAH-Test)

Der HAH-Test wurde als Makrotest in Röhrchen nach den Empfehlungen von Mayr (1956) durchgeführt.

Erythrozyten: Aus dem mit Natriumzitrat versetzten Blut weißer Leghornhühner wurden nach dreimaligem Waschen mit PBS agglutinationsfähige Erythrozyten gewonnen und mit PBS auf eine Konzentration von 0,5 bzw. 1 % eingestellt.

Antigen: Vac-Virus "Bern" wurde auf die CAM 10 Tage alter Hühnerembryonen geimpft, die Eier bei 37 °C bebrütet und das Virus vier Tage p.inf. in Form von konfluierenden Pockenherden geerntet. Diese wurden in tiefgefrorenem Zustand zerrieben und nach der Zugabe von PBS (1:5) 15 min lang bei 2000 g zentrifugiert; der virushaltige Überstand diente als Antigen .

Zur Bestimmung des HA-Titers wurde das Antigen in 2-erStufen in PBS (0,3 ml) titriert, eine 1%ige Erythrozytensuspension (0,3 ml) zu jeder Antigenverdünnung zugegeben, geschüttelt und 60 Min bei 37°C inkubiert. Als HA-Titer galt diejenige Verdünnung, bei der noch eine vollständige Agglutination der Erythrozyten eintrat.

Für den HAH-Test wurde das Antigen auf 4 HA-Einheiten mit PBS eingestellt.

Seren: Jedes Serum wurde 30 Min lang bei 56 °C inaktiviert.

HAH-Test: Jedes inaktivierte Serum (0,3 ml) verdünnten wir dreimal in 2er-Stufen in einer 1 %igen (Serumverdünnung 1:2) bzw. 0,5 %igen (jede weitere Serumverdünnungsstufe) Erythrozytensuspension (0,3 ml). Jede Serumverdünnung wurde mit Antigen (0,3 ml) versetzt, geschüttelt, 60 Min bei 37 °C inkubiert und nach weiteren 60 Min bei Zimmertemperatur abgelesen. Bei jedem Test liefen eine Erythrozyten-, Virus-, Negativserum- und Positivserum-Kontrolle mit.

Als HAH-Titer galt die höchste Serumverdünnung, bei der es noch zu einer völligen Hemmreaktion kam, d.h. die scharf begrenzten, nicht agglutinierten Erythrozytenknöpfe liefen beim Schräghalten des Röhrchens aus.

### 3.8.2.3. Neutralisationstest (N-Test)

Der Neutralisationstest wurde als Plaquereduktionstest in 96-Napf- Mikrotiterplatten (Nunc, Roskilde, Dänemark) (Mikroneutralisationstest) durchgeführt, wobei steigenden Serumverdünnungen eine konstante Virusmenge zugegeben wurde.

Antigen: Als Antigen diente die 3. RK 13-Passage von KuP-Virus "OPV 85", eingestellt auf 30-40 KID<sub>50</sub>/0,05 ml.

Seren: Alle Seren wurden 30 Min bei 56 °C inaktiviert.

Durchführung des Plaquereduktionstests: Jede Serumprobe (0,05 ml) wurde in drei Reihen/Platte mit genormten Mikrodilutern in 2er-Stufen im Anzuchtmedium verdünnt. Zu jeder Serumverdünnung gaben wir pro Napf 0,05 ml KuP-Virus "OPV 85"-Gebrauchsverdünnung zu, schüttelten die Platte und inkubierten sie 3 Stunden bei 37°C im CO<sub>2</sub>-Brutschrank. Anschließend wurden pro Napf 0,1 ml Zellsuspension (ca. 50.000 RK 13-Zellen) eingefüllt und die Platte bei 37°C im CO<sub>2</sub>-Brutschrank inkubiert. Die eingesäten Zellen bildeten nach 24 Stunden einen dichten Zellrasen. Nach 48 Stunden - in der Viruskontrolle waren zu diesem Zeitpunkt 25-30 Plaques sichtbar, erfolgte die Auswertung. Auf jeder Platte wurden als Kontrollen ein Negativserum, ein stark positives Serum und das Testvirus mitgeprüft.

Als N-Titer galt die höchste Serumverdünnung, bei der die Anzahl der Plaques um mindestens 50 % gegenüber den Plaques, die beim Negativserum (in der Verdünnung 1:2) auftraten, reduziert war.

### 3.8.2.4. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der ELISA wurde als "indirekter ELISA" nach den Beschreibungen von Marennikova et al. (1981) und Maltseva et al. (1985) durchgeführt.

Die Herstellung von Pufferlösungen, die Durchführung der einzelnen Inkubationszeiten sowie der Waschschrte erfolgte in Anlehnung an Kropp (1985).

#### Puffer:

Carbonat-Bicarbonat-Puffer, pH 9,6, wurde als Beschichtungsmedium (Coating-Puffer) verwendet: (1,59 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  + 2,93 g  $\text{NaHCO}_3$  pro 1 l Aqua dest.)

Phosphatgepufferte Natriumchloridlösung (PBS), pH 7,2, benützten wir mit 0,05 % Tween 20 (Merck, Darmstadt) zur Serumverdünnung und als Waschlösung (8,2 g  $\text{NaCl}$  + 0,4 g  $\text{KCl}$  + 0,3 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  + 1,73 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  + 0,5 ml Tween 20 pro 1 l Aqua dest.) und zusätzlich mit 5 % FKS zur Konjugatverdünnung.

#### Antigen:

Als **Virusantigen** diente grob gereinigtes, in primären HEF vermehrtes Vac-Virus "MVA" (1.HEF-Passage,  $10^7$  KID<sub>50</sub>/ml). Das Antigen wurde bereits nach 2 Tagen geerntet, wenn 50 - 60 % des Zellrasens durch einen typischen cpE verändert waren (vergleiche 3.3), nach dem Gefriertauen mit einem Sonifier Ultraschall-Desintegrator (Branson, Danbury, USA) 3x1 Min lang beschallt und durch Zentrifugieren bei 1000 g über 10 Min. von den Zelltrümmern getrennt.

Als **Kontrollantigen** dienten parallel angesetzte HEF-Zellen.

Platten: Nach vergleichenden Vorversuchen verwendeten wir Mikrotiter-Platten mit 96 Flachbodenvertiefungen (Dynatech, Plochingen).

Konjugat: Als Konjugat wurde peroxidase-konjugiertes Anti-Kaninchen-Immunglobulin von der Ziege (Sigma, München) verwendet.

Substrat: Als Substrat diente Ortho-Phenylendiamin (OPD; Sigma, München), dem in einer Konzentration von 0,4 mg/ml in 0,1 M Na-Citrat-Phosphatpuffer, pH 5,0, (0,4 g OPD + 4,67 g Zitronensäure + 9,15 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  pro 1 l Aqua dest.) kurz vor dem Gebrauch 0,005 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  zugegeben wurden.

Durchführung des ELISA: Die Platten wurden mit einer Antigenverdünnung von 1:100 beschichtet, die optimale Verdünnung war zuvor durch eine Schachbretttitration ermittelt worden. Alternierend wurden in die Vertiefungen je 100  $\mu\text{l}$  Virus- oder Kontrollantigen pipettiert. Die Antigenadsorption erfolgte während einer 3stündigen Inkubation bei 37 °C im  $\text{CO}_2$ -Brutschrank und der darauffolgenden 16stündigen Lagerung bei 4 °C im Kühlschrank. Bis zum weiteren Gebrauch ließen sich die Platten bei -20 °C einfrieren.

Nachdem die Platten aufgetaut und dreimal gewaschen waren, wurden die zu untersuchenden Seren (100  $\mu\text{l}$ ) in 2er-Stufen mit einer 12-Kanal-Pipette verdünnt. Als Kontrolle wurde jeweils ein stark positives und negatives Serum mittitriert, in der Reihe 1 auf jeder Platte ersetzen wir das Serum durch PBS. Diese Reihe diente als Leerwert für die Nullstellung des Photometers. Nach einer 60minütigen Inkubation bei 37 °C und einem dreimaligen Waschvorgang wurden 100  $\mu\text{l}$  Konjugat pro Vertiefung in einer Verdünnung von 1:1500 zugegeben, die Platten wieder 1 Stunde inkubiert und danach viermal gewaschen. Dann wurden 100  $\mu\text{l}$  Substrat in jede Vertiefung pipettiert und die Platten bis zum Entstehen der Farbreaktion 30 Min im Dunklen bei Zimmertemperatur belassen. Die Messung der Extinktion erfolgte mit einem Multiscan-Photometer (Titertek, Flow Laboratories) bei 450 nm.

#### 4. Versuche und Ergebnisse

Experimentelle Untersuchungen sollten die Wirksamkeit des Impfstoffes Vac-Virus "MVA" gegenüber einer Belastungsinfektion mit KuP-Virus "OPV 85" am Kaninchenmodell klären.

Die durch Impfung und Challenge-Infektion hervorgerufene Antikörperbildung sollte im HAH-Test, N-Test und ELISA nachgewiesen werden.

##### 4.1. Die Belastungsinfektion mit KuP-Virus "OPV 85"

Zum Nachweis des Impferfolges von Vac-Virus "MVA" wurde die **kutane und intrakutane** Belastungsinfektion mit dem KuP-Virus "OPV 85" ausgewählt.

Bei Pockeninfektionen zeigt eine Reinfektion erfahrungsgemäß bei immunen Individuen ein anderes Bild als die Erstinfektion. Die nach einer ersten Infektion mit Pockenvirus aufgebaute zelluläre Immunität ist bei einer Zweitinfektion mit Pockenvirus im Hautorgan an einer Überempfindlichkeit (delayed hypersensitivity) gegenüber dem Virus zu erkennen, die als Spätreaktion vom Tuberkulintyp auftritt. Diese Überempfindlichkeitsreaktion sollte in erster Linie zur Beurteilung der zellulären Immunität herangezogen werden, weshalb die kutane bzw. intrakutane Applikation von Vac-Virus "MVA" gewählt wurde.

##### 4.1.1. Einstellung der Testvirusdosis (Vorversuche)

Im Vorversuch bestimmten wir zunächst den Zusammenhang zwischen verschiedenen hohen Infektionsdosen von KuP-Virus "OPV 85" und dem klinischen Krankheitsbild, das diese nach kutaner und intrakutaner Applikation am ungeimpften

und voll empfänglichen Kaninchen hervorriefen und wählten dann unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse eine geeignete Dosis für die Belastungsinfektion im Hauptversuch aus.

Dazu infizierten wir ein ungeimpftes Kaninchen kutan und intrakutan mit unterschiedlichen Konzentrationen von KuP-Virus "OPV 85". Die Einzeldosen betrugen bei beiden Applikationsarten 30.000 KID<sub>50</sub>, 3.000 KID<sub>50</sub> und 300 KID<sub>50</sub>.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengefaßt.

Die Testdosis von 30.000 KID<sub>50</sub> erwies sich als zu hoch für eine Belastung. Bei der kutanen Infektion verschmolzen die Pocken am 7. Tag, dem Höhepunkt der Reaktion, über das gesamte Skarifikationsfeld zu einer einzigen, schwarzrot-hämorrhagischen Fläche, so daß Einzelpocken nicht mehr beurteilt werden konnten.

Bei der intrakutanen Infizierung riefen 30.000 KID<sub>50</sub> und die 10-fach schwächere Testdosis (3.000 KID<sub>50</sub>) annähernd gleich starke lokale Veränderungen hervor, die sich nur geringgradig unterschieden. Es war zu befürchten, daß derart starke Reaktionen keine qualitative oder quantitative Differenzierung zulassen würden.

Bei einer Testdosis von 3.000 bzw. 300 KID<sub>50</sub> bildeten sich auf den Skarifikationsfeldern hämorrhagische Einzelpocken, die zahlenmäßig und morphologisch gut zu beurteilen waren.

An den intrakutanen Infektionsstellen entwickelten sich Infiltrate mit zentralen, hämorrhagischen Nekrosen, die sich, abhängig von der Dosis, im Durchmesser unterschieden.

Wir wählten deshalb für die kutane und intrakutane Infektion mit KuP-Virus "OPV 85" eine Belastungsdosis von 3.000 und 300 KID<sub>50</sub> aus.

| Belastungsinfektion mit KuP-Virus "OPV 85" |                               |                                                                                               |                                                                           |
|--------------------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| Modus                                      | Dosis<br>in KID <sub>50</sub> | klinisches Bild<br>lokale Reaktion<br>an der Infektions-<br>stelle                            | Allgemeinreaktion                                                         |
| kutan                                      | 30.000                        | konfluierende,<br>hämorrhagische Pocken;<br>starke Beteiligung der<br>Umgebung                | starke Generalisation<br>Fieber bis 40,1 °C,<br>zahlreiche Sekundärpocken |
|                                            | 3.000                         | ca. 25, teilweise<br>konfluierende Pocken;<br>starke Beteiligung der<br>Umgebung              |                                                                           |
|                                            | 300                           | vereinzelte Pocken;<br>wenig Beteiligung der<br>Umgebung                                      |                                                                           |
| intra-<br>kutan                            | 30.000                        | 2,5 cm großes Infiltrat<br>mit zentraler,<br>hämorrhagischer Nekrose;<br>starkes Senkungsödem |                                                                           |
|                                            | 3.000                         | 2,5 cm großes Infiltrat<br>mit zentraler Nekrose;<br>starkes Senkungsödem                     |                                                                           |
|                                            | 300                           | 1,5 cm großes Infiltrat<br>mit zentraler Nekrose;<br>geringes Senkungsödem                    |                                                                           |

Tabelle 5 Zusammenhang zwischen Dosis und klinischem Erkrankungsbild bei einer Testinfektion mit KuP-Virus "OPV 85" am ungeimpften Kaninchen

Zur Überprüfung dieser Dosis infizierten wir in einem weiteren Vorversuch ein ungeimpftes und ein Kaninchen, das zweimal intramuskulär im Abstand von 26 Tagen mit Vac-Virus "MVA" in einer Dosis von  $0,5 \times 10^7$  KID<sub>50</sub> geimpft worden war, kutan und intrakutan mit 3.000 bzw. 300 KID<sub>50</sub> KuP-Virus "OPV 85", wobei bei dem geimpften Kaninchen die Belastungsinfektion 7 Tage nach der Wiederimpfung durchgeführt wurde.

Eine Übersicht über die Versuchsergebnisse gibt die Tabelle 6.

Während das ungeimpfte Kaninchen an einer generalisiert verlaufenden Pockeninfektion erkrankte, reagierte das geimpfte Kaninchen mit einer typischen Wiederimpfreaktion: der Krankheitsverlauf war deutlich beschleunigt und das klinische Erkrankungsbild abgeschwächt. Die Immunität wurde nicht durchbrochen; sie hatte ausgereicht, das klinische Bild einer Erstinfektion zu verhindern.

#### 4.1.2. Unschädlichkeit einer Immunisierung mit Vac-Virus "MVA"

Bei keinem Kaninchen kam es nach der Immunisierung mit Vac-Virus "MVA" zu lokalen oder postvakzinalen Komplikationen. Es waren weder Störungen des Allgemeinbefindens noch Empfindlichkeitsreaktionen an den Injektionsstellen zu beobachten.

| Kanin-<br>chen                                                                    | Belastungsinfektion mit KuP-Virus "OPV 85" |                             |                                                                                  |                                                                           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|-----------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
|                                                                                   | Modus                                      | Dosis/<br>KID <sub>50</sub> | klinisches Bild<br>lokale Reaktion<br>an der Infektions-<br>stelle               | Allgemeinreaktion                                                         |
| nicht<br>geimpft                                                                  | kutan                                      | 3.000                       | ca. 25, teilweise<br>konfluierende Pocken;<br>starke Beteiligung der<br>Umgebung | starke Generalisation<br>Fieber bis 40,1 °C,<br>zahlreiche Sekundärpocken |
|                                                                                   |                                            | 300                         | 7 Pocken;<br>wenig Beteiligung der<br>Umgebung                                   |                                                                           |
|                                                                                   | intra-<br>kutan                            | 3.000                       | 2,5 cm großes Infiltrat<br>starkes Senkungsödem                                  |                                                                           |
|                                                                                   |                                            | 300                         | 1,5 cm großes Infiltrat<br>starkes Senkungsödem                                  |                                                                           |
|                                                                                   | kutan                                      | 3.000                       | 7 hämorrhagische-<br>Pocken;<br>keine Beteiligung der<br>Umgebung                |                                                                           |
|                                                                                   |                                            | 300                         | 1 Pocke;<br>wenig Beteiligung der<br>Umgebung                                    |                                                                           |
| zweimal<br>geimpft<br>i.m.<br>1,0x10 <sup>7</sup><br>KID <sub>50</sub> ,<br>"MVA" | intra-<br>kutan                            | 3.000                       | 1,2 cm großes Infiltrat<br>kein Senkungsödem                                     |                                                                           |
|                                                                                   |                                            | 300                         | 0,8 cm großes Infiltrat<br>kein Senkungsödem                                     |                                                                           |
|                                                                                   |                                            |                             |                                                                                  |                                                                           |
|                                                                                   |                                            |                             |                                                                                  |                                                                           |

Tabelle 6 Zusammenhang zwischen Dosis und klinischem Erkrankungsbild bei einer Testinfektion mit KuP-Virus "OPV 85" bei einem geimpften und ungeimpften Kaninchen

#### 4.1.3. Wirksamkeit einer Immunisierung mit Vac-Virus "MVA" gegenüber einer Belastungsinfektion mit KuP-Virus "OPV 85" (Hauptversuch)

Die Belastungsinfektion wurde zur Überprüfung des Impferfolges bei immunisierten und zur Kontrolle bei nicht geimpften Tieren mit 3.000 und 300 KID<sub>50</sub> KuP-Virus "OPV 85" kutan und intrakutan durchgeführt.

##### 4.1.3.1 Klinisches Bild der Kontrollinfektion mit KuP-Virus "OPV 85"

Zwei ungeimpfte Kaninchen (Nr. 189 und Nr. 000) wurden zur selben Zeit wie die geimpften Tiere als Kontrolltiere kutan und intrakutan mit dem gleichen Virusmaterial infiziert.

Die Kaninchen reagierten bei der kutanen und intrakutanen Infektion mit einer lokalen Pocken- bzw. Infiltratbildung und Allgemeinsymptomen.

Bei der **kutanen Infektion** betrug die Inkubationszeit 3-4 Tage. Dann bildeten sich auf dem Feld I (3.000 KID<sub>50</sub>) zwischen 20 und 40 konfluierende, auf dem Feld II (300 KID<sub>50</sub>) bis zu 10 einzelne, ca. 1-2 mm große, hellrote, runde, glänzende Maculae, von denen viele bereits ein punktförmiges, dunkelrotes, hämorrhagisches Zentrum aufwiesen. Die wenig erhabenen und mehr flächigen Pockenläsionen nahmen täglich um ungefähr 1-1,5 mm an Größe zu, ihr hämorrhagisches Zentrum breitete sich mehr und mehr peripher über den ganzen Herd aus. Die Pocken waren von einer 1-2 mm breiten, hellroten, ringförmigen Area umgeben, die sich ebenfalls verbreiterte. Ab dem 5. Tag fanden sich auf beiden Feldern bis zu 15 Nebenpocken, die sich verzögert analog zu den Primärpocken entwickelten. Die entzündliche Reaktion erreichte am 7. Tag ihren Höhepunkt: auf dem Feld I konfluieren die Primär- und Nebenpocken, so daß die ganze stark gerötete und ödematisierte Skarifikationsfläche mit rot-schwarzen Nekrosen bedeckt war, während sich auf dem Feld II bis zu 5 mm große, leicht ödematisierte und erhabene Primärpocken mit 2-3 mm großen, hämorrhagischen, zentralen Nekrosen und kleinere Nebenpocken befanden, die von hochrot-entzündeten, 2 mm breiten Areae

umgeben waren. Ab dem 8. Tag begannen die Läsionen mit schwarzen Krusten abzutrocknen, die entzündliche Reaktion klang ab und die kraterartigen, 5-6 mm großen Pocken bestanden dann aus einer 3-4 mm großen, schwarzen, ca 1 mm tief eingesunkenen Kruste und einem 1-2 mm breiten, hellvioletten Wall, die Nebepocken waren im Durchmesser kleiner und von ähnlichem Aussehen. Ab dem 12. Tag lösten sich die schwarzen, 1 mm dicken Krusten ab, und nach 4 Wochen waren alle Pocken ohne Narbenbildung abgeheilt.

Das klinische Bild einer kutanen Infektion mit KuP-Virus beim ungeimpften Kontrollkaninchen am 5., 7. und 9. Tag p.inf. zeigen die Abbildungen 1 bis 3.

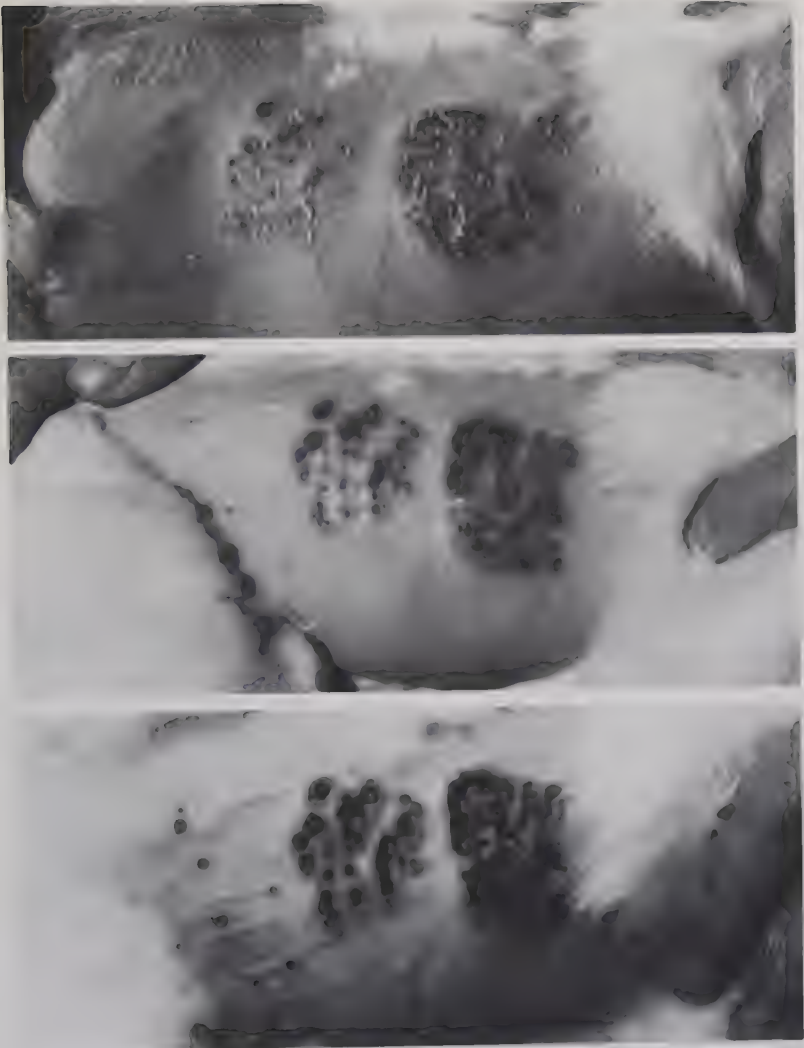


Abbildung 1, 2 und 3: Klinisches Bild nach kutaner Belastungsinfektion mit KuP-Virus "OPV 85" am 5. Tag (oben), 7.Tag (Mitte) und 9. Tag (unten) post. beim ungeimpften Kaninchen

Bei der **intrakutanen Infektion** bildete sich nach 24 Stunden eine Rötung um die Infektionsstelle, nach 48 Stunden war ein kleines, hirsekorngroßes, scharf abgesetztes Knötchen in der Haut zu palpieren, das sich am 3. Tag zu einem im Durchmesser 1 cm großen (3.000 KID<sub>50</sub>) bzw. 0,5 cm großen (300 KID<sub>50</sub>), flachen, weichen, gut abgegrenzten und verschieblichen Knoten mit einer hellroten Verfärbung im Zentrum entwickelte. Die beiden derber gewordenen Infiltrate vergrößerten sich in den folgenden Tagen. Die zunächst hellrote, dann dunkelrote, hämorrhagische, zentrale Verfärbung breitete sich weiter über das ganze Infiltrat aus und begann am 6. Tag im Zentrum und dann nach peripher fortschreitend nekrotisch einzuschmelzen. Am 7.Tag, dem Höhepunkt der Reaktion, war das zwischen 2,5 cm (3.000 KID<sub>50</sub>) und 2 cm (300 KID<sub>50</sub>) große, kirschförmige, 5-10 mm über die Hautoberfläche erhabene, derbe Infiltrat hochrot entzündet, heiß, nicht mehr verschieblich und nur schlecht abgrenzbar. Die rot-schwarzen Nekrosen umgab ein 5 mm breiter, tiefroter, hämorrhagischer Ring. Das umgebende Gewebe war gerötet und geschwollen, das warme und weiche Ödem senkte sich nach ventral. In den folgenden Tagen klang der entzündliche Prozeß ab, die zentralen Nekrosen vergrößerten sich noch mehr und wurden zu schwarzen, dicken Krusten, die, vom Zentrum ausgehend, einsanken, so daß sich beide Infiltrate am 12. Tag als 1,5-2 cm große, schwarz verkrustete, 2 mm tiefe Krater mit einem 0,5 cm hohen, hell-violetten, derben Randwall darstellten. Eine Woche später fielen die Krusten ab und ließen bis zu 3 mm tiefe, kraterförmige Gewebsvertiefungen zurück, die nach 4 Wochen als kleine, weißliche Narbe abheilten.

Das klinische Bild einer intrakutanen Infektion mit KuP-Virus "OPV 85" am 5. 7. und 9. Tag p.inf. zeigen die Abbildungen 4 bis 6.

Während der lokalen Pocken- und Infiltratentwicklung traten **Allgemeinsymptome** auf. Die Tieren litten vom 6.- 9. Tag an hohem Fieber (39,9-40,1 °C) und waren während dieser Zeit teilnahmslos, apathisch und inappetent. Ab dem 7. Tag generalisierte das Virus. Auf der enthaarten Haut waren, sternenhimmelförmig verteilt, zahlreiche Sekundärpocken zu sehenn, die sich aus 1-2 mm großen, roten Papeln und Maculae erst in kurzzeitig hochrote, kleine Bläschen und dann in 2-3 mm große, gelbliche, leicht erhabene Pusteln umwandelten. An den schwach behaarten Ohren zeigten sich 2-3 Tage später ebenfalls zahlreiche Sekundärpocken, während auf den Schleimhäuten von Maul, Nase, Vulva oder Penis keine Veränderungen zu beobachten waren.



Abbildung 4, 5 und 6: Klinisches Bild nach intrakutaner Belastungsinfektion mit KuP-Virus "OPV 88" am 5. Tag (oben), 7. Tag (Mitte) und 9. Tag (unten) p.inf. beim ungeimpften Kaninchen

#### 4.1.3.2. Klinisches Bild der Belastungsinfektion mit KuP-Virus "OPV 85" bei geimpften Tieren

Alle 15 mit Vac-Virus "MVA" immunisierten Kaninchen wurden der kutanen und intrakutanen Belastungsinfektion mit KuP-Virus "OPV 85" unterzogen. Wir bildeten 6 verschiedene Gruppen, die sich im verwendeten Impfmodus bezüglich

1. der **Zahl der Impfungen** (einmal bzw. zweimal)
2. der **Applikationsart** (subkutan bzw. intramuskulär) und
3. in der **Dosis** des Impfstoffes ( $0,5 \times 10^7$  KID<sub>50</sub> bzw.  $1,0 \times 10^7$  KID<sub>50</sub>) unterschieden.

Alle geimpften Tiere (Ausnahme: Nr. 181) reagierten nach kutaner und intrakutaner Belastungsinfektion mit einer allergischen Hautreaktion vom verzögerten Typ (delayed hypersensitivity), die durch einen schnelleren Verlauf mit früherem Beginn und rascherem Abklingen, sowie durch mildere Krankheitserscheinungen charakterisiert war.

Einen Überblick über die Unterschiede im Krankheitsverlauf und im klinischen Erscheinungsbild zwischen geimpften und ungeimpften Kaninchen gibt Tabelle 7

Die geimpften Kaninchen reagierten nach der **kutanen und intrakutanen Infektion** in der Regel mit einer lokalen Pockenbildung bzw. Infiltratbildung und nur vereinzelt, abhängig von den Impfparametern, mit Allgemeinsymptomen.

Bei einzelnen Kaninchen waren bereits nach wenigen Stunden beide Skarifikationsfelder und die intrakutanen Injektionsstellen deutlich gerötet und ödematisiert. Diese Überempfindlichkeitsreaktion vom Soforttyp III (Arthus-Phänomen) bildete sich nach 1-2 Tagen wieder vollkommen zurück. Tiere mit einer starken Sofortreaktion waren in der Regel gut gegen den Challenge mit KuP-Virus "OPV 85" geschützt.

|                                                     |       |                                                                                                |                                                                                              |                                                                      |  |
|-----------------------------------------------------|-------|------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|--|
| Belastung<br>infektion<br>mit KuP-Virus<br>"OPV 85" |       | ungeimpfte Kaninchen<br>(Kontrollen)                                                           |                                                                                              | geimpfte Kaninchen<br>(verschiedene Impf-<br>parameter)              |  |
| Krank-<br>heits-<br>verlauf                         |       | Beginn: ab Tag 3<br>Höhepunkt: am Tag 7<br>Rückbildung: ab Tag 9                               |                                                                                              | Beginn ab Tag 2<br>Höhepunkt: am Tag 5<br>Rückbildung: ab Tag 6      |  |
| Infektions-<br>modus                                |       | dosis<br>in<br>KID <sub>50</sub>                                                               | klinische Symptome                                                                           |                                                                      |  |
| kutan                                               | 3.000 | bis zu 40 konfluierende<br>4-5 mm große,<br>hämmorrhag. Primärpocken<br>zahlreiche Nebenpocken | keine bzw. bis zu 10<br>3-4 mm große<br>hämmorrhag. Primärpocken<br>selten wenig Nebenpocken |                                                                      |  |
|                                                     | 300   | bis zu 10 Primärpocken<br>bis zu 8 Nebenpocken                                                 | keine bzw. bis zu 3<br>Primärpocken<br>0-2 Nebenpocken                                       |                                                                      |  |
| intra-<br>kutan                                     | 3.000 | 2,5 cm großes,<br>hämmorrhag. Infiltrat<br>starkes Senkungsödem                                | 0,8-1,5 cm großes,<br>hämmorrhag. Infiltrat<br>schwächeres Senkungsödem                      |                                                                      |  |
|                                                     | 300   | 2,0 cm großes Infiltrat<br>starkes Senkungsödem                                                | 0,5-1 cm großes Infiltrat<br>schwaches Senkungsödem                                          |                                                                      |  |
|                                                     |       |                                                                                                |                                                                                              |                                                                      |  |
|                                                     |       | Generalisation: immer<br>mit hohem Fieber,<br>zahlreichen Sekundär-<br>pocken                  |                                                                                              | Generalisation: selten,<br>kein Fieber,<br>wenig Sekundär-<br>pocken |  |

Tabelle 7 Unterschiede zwischen der Normalreaktion bei ungeimpften Kontrollen und der Wiederimpfreaktion bei Kaninchen, die mit Vac-Virus "MVA" (unterschiedlicher Impfmodus) geimpft wurden, nach einer kutanen und intrakutanen Belastungsinfektion mit KuP-Virus "OPV 85"

Bei der **kutanen Infektion** bildeten sich bereits am 2.-3. Tag p.inf. auf beiden Feldern (3.000 bzw. 300 KID<sub>50</sub>) kleine, hellrote, glänzende Maculae mit einem punktförmigen, dunkelrot-hämorrhagischem Zentrum. Ihre Zahl schwankte, abhängig von den Impfparametern, sehr stark, war jedoch immer gegenüber den Kontrollen stark vermindert. Aus den Maculae entwickelten sich wie bei den ungeimpften Kaninchen Primärpocken mit hämorrhagischen Nekrosen, die aber im Vergleich stets kleiner waren, Nebenpocken traten nur vereinzelt auf. Bereits am 5.- 6. Tag erreichte die entzündliche Reaktion ihren Höhepunkt, die Skarifikationsfelder waren in der Regel nicht ödematisiert und gerötet. Ab dem 7. Tag begann die Rückbildung, die Nekrosen trockneten dann mit schwarzen, leicht einsinkenden Krusten ab, die sich ab dem 9. Tag ablösten. Alle Pockenläsionen waren 3 Wochen p.inf. ohne Defekt abgeheilt.

Das klinische Bild einer kutanen Belastungsinfektion mit KuP-Virus "OPV 85" am geimpften Tier 5 und 7 Tage p.inf. wird in Abbildung 7 und 8 dargestellt.

Einen Überblick über die Zahl der Primärpocken, die sich nach einer Infektion mit 3.000 und 300 KID<sub>50</sub> KuP-Virus "OPV 85" bei geimpften und ungeimpften Kaninchen entwickelten, gibt die Abbildung 9.



Abbildung 7 und 8. Klinisches Bild nach kutaner Belastungsinfektion mit KuP-Virus "OPV 85" am 5. Tag (oben) und 7. Tag (unten) post. beim geimpften Kanarienvogel.

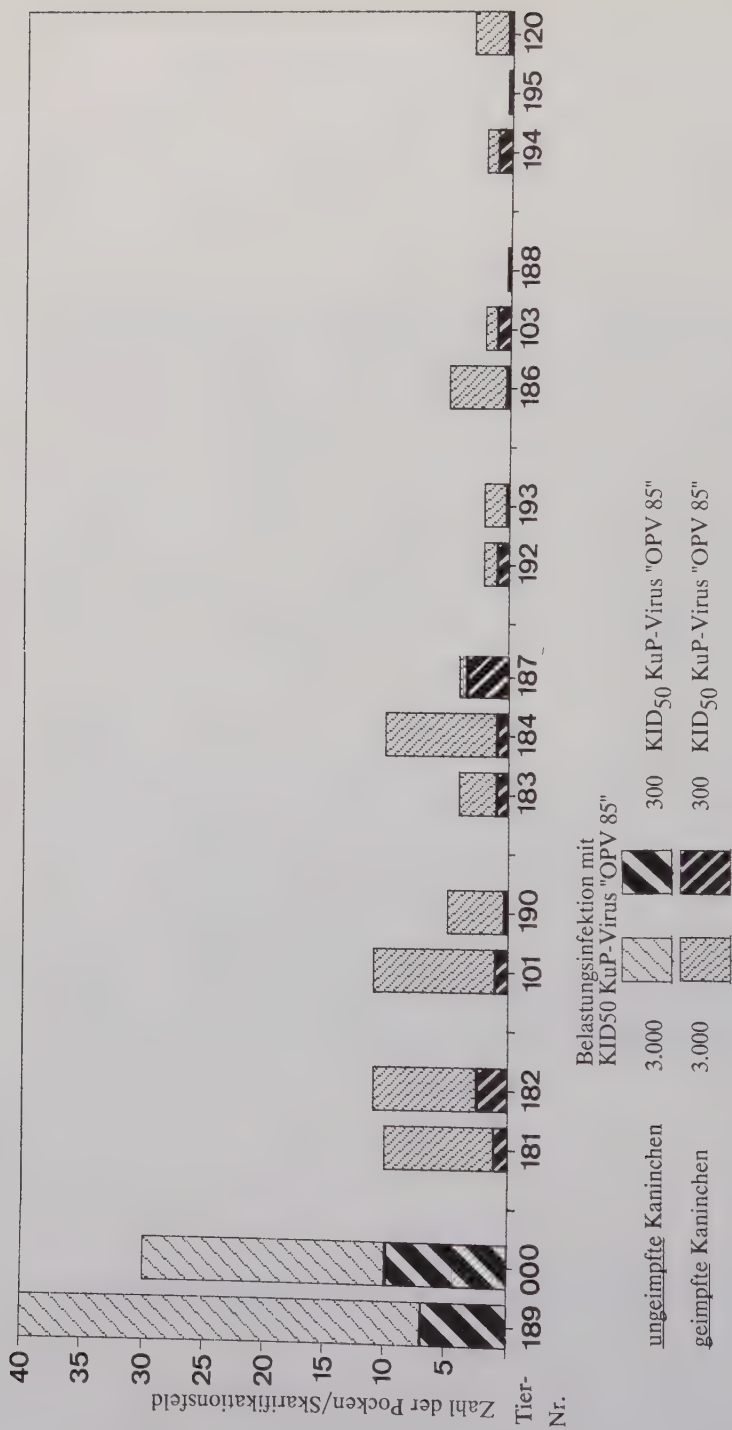


Abb. 9: Zahl der Pocken/Scarifikationsfeld nach kutaner Belastungsinfektion mit 300 und 3.000 KID<sub>50</sub> KuP-Virus "OPV 85" bei mit Vac-Virus "MVA" bei geimpften (Gruppe 1-6) und bei ungeimpften (Gruppe 7) Kaninchen

Bei der **intrakutanen Infektion** entwickelten sich ab dem 2. Tag an beiden Injektionsstellen derbe, knotenförmige Infiltrate mit einer hellroten Verfärbung im Zentrum. Sie vergrößerten sich in den folgenden Tagen, wobei sich ihr Zentrum schnell dunkelrot-hämorrhagisch verfärbte und ab dem 4. Tag nekrotisch einschmolz. Die Durchmesser von Infiltrat und Nekrose variierten, abhängig von den Impfparametern, waren aber stets geringer als bei den Kontrollen. Am 5. Tag, dem Höhepunkt der Reaktion, lagen die Infiltratdurchmesser bei der Infektionsdosis von 3.000 KID<sub>50</sub> zwischen 0,8 und 1,5 cm, bei der geringeren Infektionsdosis von 300 KID<sub>50</sub> zwischen 0,4 und 1,5 cm. Beide Infiltrate waren am 6. und 7. Tag im Durchschnitt nur halb so groß wie bei den Kontrollen. Sie ähnelten diesen in ihrem Aussehen, nur waren die schwarzrot-hämorrhagischen Nekrosen deutlich kleiner. Bei einem Teil der Tiere traten leichte Senkungsödeme auf. Ab dem 7. Tag sanken die schwarzen, zentralen Krusten ein und waren dann von einem kraterartigen Wall umgeben, der nach und nach abflachte und abzuheilen begann.

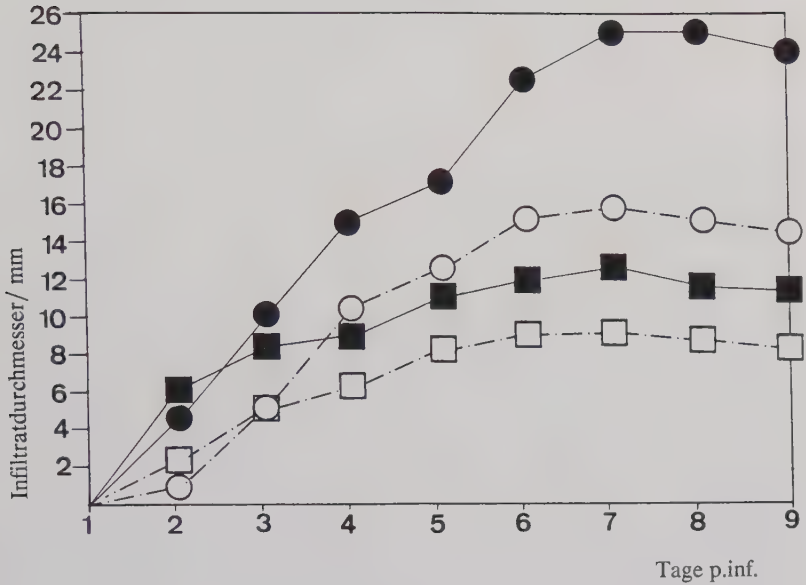
Das klinische Bild einer intrakutanen Belastungsinfektion mit KuP-Virus "OPV 85" 5 und 7 Tage p.inf. zeigen die Abbildungen 10 und 11.

Die Entwicklung des durchschnittlichen Infiltratdurchmessers nach der intrakutanen Infektion mit 3.000 und 3.00 KID<sub>50</sub> bei geimpften und ungeimpften Kaninchen ist in Abbildung 12 dargestellt.

Während der lokalen Pocken- und Infiltratbildung kam es nur in sehr seltenen Fällen in Abhängigkeit von der Zahl der verabreichten Impfungen zu einer Generalisation. Dann waren ab dem 5. Tag einige wenige Sekundärpocken auf der enthaarten oder schwach behaarten Haut zu sehen, die sich wie bei den Kontrollen aus kleinen Papeln und Maculae in Bläschen und Pusteln umwandelten, dabei kam es jedoch zu keiner Temperaturerhöhung.



Abbildung 10 und 11: Klinisches Bild nach intrakutaner Belastungsinfektion mit KuP-Virus "OPV 85" am 5. Tag (oben) und 7. Tag (unten) p.inf. beim geimpften Kaninchen



Belastungsinfektion  
mit KuP-Virus "OPV 85"  
3.000 300 KID<sub>50</sub>

ungeimpfte Kaninchen —●— ○—  
geimpfte Kaninchen —■— □—

Abb. 12: Durchschnittlicher Infiltratdurchmesser nach intrakutaner Belastungsinfektion mit 300 und 3.000 KID<sub>50</sub> KuP-Virus "OPV 85" bei mit Vac-Virus "MVA" geimpften (Gruppe 1-6) und bei ungeimpften (Gruppe 7) Kaninchen

#### 4.1.3.3. Bewertung des klinischen Bildes der Belastungsinfektion mit KuP-Virus "OPV 85" bei immunisierten Kaninchen

Die Bewertung der durch die Belastungsinfektion mit KuP-Virus "OPV 85" hervorgerufenen Krankheitserscheinungen war nicht unproblematisch.

Die Pockeneffloreszenzen, die sich bei der **kutanen** Infektion mit KuP-Virus "OPV 85" auf den Skarifikationsfeldern entwickelten, bildeten nicht die "typischen" Verlaufsformen einer Vac-Virus-Infektion wie Papeln, Bläschen, Pusteln, die neben dem zeitlichen Verlauf ein Hauptkriterium zur Bewertung von Wiederimpfreaktionen bei der Pockenschutzimpfung des Menschen sind (Herrlich, 1965). Wir beobachteten auf den Feldern lediglich das Entstehen von Maculae, die vom Zentrum ausgehend hämorrhagisch eingeschmolzen wurden. Nur wenn es zu einer Generalisation des Virus gekommen war, wies ein Teil der Sekundärpocken die "typischen" Pockenformen mit einem hämorrhagischem Einschlag auf.

Die nachfolgende vergleichende Beurteilung der kutanen Infektion stützt sich deshalb auf folgende Parameter: Zahl der lokalen Pockeneffloreszenzen (Primär- und Nebenpocken), Beteiligung des umgebenden Gewebes, Anzeichen einer Generalisierung und zeitlicher Verlauf.

Die **intrakutane Infektion** wurde nach dem Infiltratdurchmesser, der Beteiligung des umgebenden Gewebes und ebenfalls nach den Anzeichen einer Generalisation bewertet. Sie war wegen großer Variationsbreiten innerhalb der einzelnen Gruppen schwieriger als die kutane Infektion zu beurteilen.

Die Reaktionen, die bei Impfungen durch eine kutane und intrakutane Belastungsinfektion mit KuP-Virus "OPV 85" mit einer Dosis von 3.000 und 300 KID<sub>50</sub> hervorgerufen wurden, bewerteten wir folgendermaßen:

Als **Sofortreaktion** wurde eine innerhalb weniger Stunden p.inf. auftretende Reaktion gewertet, bei der es zu einer Rötung und Ödematisierung des skarifizierten Feldes bzw. der intrakutanen Injektionsstelle kam, die nach 1-2 Tagen wieder abgeklung und dann in die folgenden Reaktionstypen überging. Die Sofortreaktion ist eine Überempfindlichkeitsreaktion vom Soforttyp III (Arthus-Phänomen) (Herrlich, 1965).

Als **reaktionslos** beurteilten wir eine Infektion dann, wenn auf dem Skarifikationsfeld bzw. an der intrakutanen Injektionsstelle keine lokalen Veränderungen entstanden und sich keine generalisierte Pockenerkrankung entwickelte.

Bewertung: Die Impfung verhinderte ein Angehen der Infektion, die Tiere waren gegenüber der verwendeten Infektionsdosis voll immun.

Die **Schnellreaktion** war durch einen beschleunigten Verlauf und eine sehr deutliche Abschwächung des klinischen Bildes gegenüber den Kontrollen charakterisiert.

Sie begann am 2.- 3. Tag p. inf., erreichte ihren Höhepunkt am 5.- 6. Tag und klang ab dem 7. Tag ab.

Bei der kutanen Infektion entwickelten sich deutlich weniger und kleinere Pocken als bei den Kontrollen, die Umgebung war kaum beteiligt.

Bei der intrakutanen Infektion bildeten sich Infiltrate, deren Durchmesser geringer als der der ungeimpften Tiere war, sie wiesen auch ein leichtes Senkungsödem auf. Nie kam es zu einer generalisierten Pockenerkrankung.

Bewertung: Die Schnellreaktion ist eine Überempfindlichkeitsreaktion vom verzögerten Typ (delayed hypersensitivity) und als typische Wiederimpfreaktion (Frühreaktion bei Wiederimpfungen der Pockenschutzimpfung des Menschen nach Herrlich, 1965) zu werten. Die Tiere waren immun gegenüber der verwendeten "OPV 85"-Infektionsdosis.

Die **beschleunigte Reaktion** war durch einen etwas schnelleren Verlauf und durch eine geringgradige Abschwächung des klinischen Bildes gegenüber den Kontrollen gekennzeichnet.

Bei der kutanen Infektion entwickelten sich weniger und kleinere Pocken als bei den Kontrollen, das umgebende Gewebe war gerötet und ödematisiert.

Bei der intrakutanen Infektion bildeten sich Infiltrate, deren Durchmesser etwas geringer waren als der der ungeimpften Tiere, sie waren von sehr starken Senkungsödemen begleitet. Immer kam es im Laufe der Infektion zu einer leichten Generalisation mit Auftreten von einzelnen Sekundärpocken auf der enthaarten Haut.

Bewertung: Die beschleunigte Reaktion ist als geringgradige Überempfindlichkeitsreaktion vom verzögerten Typ (delayed hypersensitivity) und als fragliche Wiederimpfreaktion (beschleunigte Reaktion bei Wiederimpfungen der Pockenschutzimpfung des Menschen nach Herrlich, 1965) zu werten. Die Tiere waren nur teilimmun gegenüber der verwendeten "OPV 85"-Infektionsdosis.

Die **normale Reaktion** verlief zeitlich und klinisch wie bei den nicht geimpften Kontrollen ab.

Sie begann ab dem 3. Tag p. inf., erreichte ihren Höhepunkt am 7.- 8. Tag und klang ab dem 9. Tag ab.

Bei der kutanen Infektion entwickelten sich auf dem Feld I (3.000 KID<sub>50</sub>) zwischen 20 und 40, z. T. konfluierende Primär- und zahlreiche Nebenpocken, auf dem Feld II (300 KID<sub>50</sub>) zwischen 7 und 10 Primär- und ebenfalls zahlreiche Nebenpocken. Das umgebende Gewebe war stark gerötet und ödematisiert.

Bei der intrakutanen Infektion hatte das Infiltrat I (3.000 KID<sub>50</sub>) einen Durchmesser von ca. 2,5 cm, das Infiltrat II (300 KID<sub>50</sub>) einen von ca. 2,0 cm. Es traten starke, fingerdicke, derbe Senkungsödeme auf. Immer entwickelte sich eine starke generalisierende Pockenerkrankung mit hohem Fieber bis 40,1 °C und zahlreichen Sekundärpocken an der unbehaarten und schwach behaarten Haut (Ohren).

Bewertung: Die Reaktion war als Erstinfektionsreaktion (Reaktion vom Erstimpftyp bei Wiederimpfungen der Pockenschutzimpfung des Menschen nach Herrlich 1965) zu werten. Die Tiere waren nicht immun.

Eine zusammenfassende Darstellung des Bewertungsschema gibt Tabelle 8.

Ausgehend von diesem Bewertungsschema waren, abhängig vom Impfmodus (Zahl der Impfungen, Applikationsart und Impfdosis) 12 von insgesamt 15 mit Vac-Virus "MVA" immunisierten Kaninchen gegenüber einer Belastungsinfektion mit KuP-Virus "OPV 85" immun, bei 2 Kaninchen (Nr. 182 und 190) wurde nur eine Teilimmunität festgestellt und 1 Kaninchen (Nr. 181) war nicht geschützt.

Dieses Kaninchen (Nr. 181) erkrankte stärker als die nicht geimpften Kontrollen an einer schweren generalisierten Pockenerkrankung mit unzähligen Sekundärpocken auf der unbehaarten und schwach behaarten Haut und mit hohem Fieber ( $40,3^{\circ}\text{C}$ ) vom 2.- 8. Tag p.inf.. Ab dem 16. Tag p.inf. litt das Kaninchen an einer Orchitis des rechten Hodens, auf dem Skrotum waren 6 ca. 7 mm große, gelbliche Pusteln zu sehen. Bei der histologischen Untersuchung des Hodens wurden eine eitrig-nekrotisierende Orchitis und Epididymitis festgestellt. Es konnte jedoch nicht geklärt werden, ob sie im Rahmen der Belastungsinfektion auftrat oder ob die besonders schwere Form der Pockenerkrankung eine Folge einer bereits bestehenden Hodenentzündung war.

Da der verwendete Immunisierungsmodus einen großen Einfluß auf den Impferfolg ausübte, wird bei den übrigen Kaninchen der Zusammenhang zwischen der Zahl der Impfungen, der Applikationsart und der Impfdosis im einzelnen besprochen.

| Reaktion               | Infektionsmodus              | dosis<br>KID <sub>50</sub> | klinisches Bild<br>lokale Reaktion                                                                                                                 | Allgemeinreaktion                                         | Krankheitsverlauf                                      | Bewertung       |
|------------------------|------------------------------|----------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|-----------------|
| Normalreaktion         | kut.                         | 3.000<br>300               | 20-40 Primärpocken<br>zahlr. Nebenpocken<br>7-10 Primärpocken<br>zahlr. Nebenpocken<br>Felder stark gerötet u. ödematisiert                        | Generalisation:<br>hohes Fieber,<br>zahlr. Sekundärpocken | Beginn:<br>ab 3./<br>4. Tag<br>Höhepunkt:<br>7. Tag    | nicht immun     |
|                        | i.k.                         | 3.000<br>300               | Infiltrat-Ø: 2,5 cm<br>Infiltrat-Ø: 2,0 cm<br>starkes Senkungs-<br>ödem                                                                            |                                                           |                                                        |                 |
| beschleunigte Reaktion | kut.                         | 3.000<br>300               | weniger Primär- u. Nebenpocken<br>Feld gerötet u. ödematisiert                                                                                     | kein Fieber<br>wenige Sekundärpocken                      | Beginn:<br>ab 2./<br>3. Tag<br>Höhepunkt:<br>5./6. Tag | teilweise immun |
|                        | i.k.                         | 3.000<br>300               | Infiltrat-Ø kleiner<br>starkes Senkungsödem                                                                                                        |                                                           |                                                        |                 |
| Schnellreaktion        | kut.                         | 3.000<br>300               | bis zu 10 Primärpocken, einzelne Tiere mit wenig Nebenpocken<br>bis zu 5 Primärpocken<br>keine Nebenpocken<br>Felder nicht ödematisiert u. gerötet |                                                           | Beginn:<br>ab 2./<br>3. Tag<br>Höhepunkt:<br>5./6. Tag | immun           |
|                        | i.k.                         | 3.000<br>300               | Infiltrat-Ø: 1,5 cm<br>Infiltrat-Ø: 1,0 cm<br>kein oder schwaches Senkungsödem                                                                     |                                                           |                                                        |                 |
| keine Reaktion         | kut. 3.000<br>u. 300<br>i.k. |                            |                                                                                                                                                    |                                                           |                                                        | immun           |
| Sofortreaktion         | kut. 3.000<br>u. 300<br>i.k. |                            | Felder und Injektionsstellen stark gerötet u. ödematisiert                                                                                         |                                                           | Beginn:<br>wenige Std.<br>p.inf.                       |                 |

Tabelle 8 Bewertung der Immunität mit Hilfe der Wiederimpfreaktion nach einer kutanen und intrakutanen Belastungsinfektion mit KuP-Virus "OPV 85" bei einer Dosis von 3.000 und 300 KID<sub>50</sub>

#### 4.1.3.4. Wirksamkeit der Zahl der durchgeführten Impfungen mit Vac-Virus "MVA" gegenüber einer Belastungsinfektion mit KuP-Virus "OPV 85"

In diesem Versuch sollte geprüft werden, ob die Kaninchen nach einmaliger Impfung mit Vac-Virus "MVA" ebensogut gegenüber einer Belastungsinfektion mit KuP-Virus "OPV 85" geschützt waren wie nach einer Grund- und Wiederimmunisierung.

Vier Kaninchen wurden **einmal** geimpft: 2 Tiere der Gruppe 1 erhielten je  $1,0 \times 10^7$  KID<sub>50</sub> subkutan, 2 Tiere der Gruppe 2 die gleiche Dosis intramuskulär appliziert. Sechs Kaninchen immunisierten wir **zweimal**: 3 Tiere der Gruppe 5 wurden subkutan, 2 Tiere der Gruppe 6 intramuskulär mit je  $1,0 \times 10^7$  KID<sub>50</sub> grund- und nach 26 Tagen auf die gleiche Weise revakziniert. Bei allen Tieren erfolgte 40 Tage nach der Erstimmunisierung die Belastungsinfektion.

Die nur **einmal** geimpften Kaninchen erkrankten deutlich schwerer an Kuhpocken als die zweimal immunisierten Tiere. Nur ein Kaninchen (Nr. 101) wies eine belastbare Immunität gegenüber der Belastungsinfektion auf, die übrigen Kaninchen waren teilimmun (Nr. 182 und 190) bzw. nicht immun (Nr. 181) und erkrankten an einer leichten bzw. schweren generalisierten Pockeninfektion. Bei der Belastungsinfektion entwickelten sich auf dem Feld I ( $3.000$  KID<sub>50</sub>) zwischen 5 und 11, auf dem Feld II ( $300$  KID<sub>50</sub>) bis zu 2, 3-4 mm große Primär- und vereinzelte Nebenpocken. Der Durchmesser der intrakutanen Infiltrate schwankte zwischen 1,5 und 2,5 cm ( $3.000$  KID<sub>50</sub>) bzw. 0,8 und 1,5 cm ( $300$  KID<sub>50</sub>), immer traten Senkungsödeme auf.

Alle **zweimal** vakzinierten Kaninchen waren gegen Kuhpocken geschützt, bei keinem von ihnen kam es zu einer Virusgeneralisation. Bei der kutanen Infektion bildeten sich weitaus weniger Pocken: auf dem Feld I ( $3.000$  KID<sub>50</sub>) keine bzw. bis zu 5 kleine Primär- und selten eine Nebenpocke, auf dem Feld II ( $300$  KID<sub>50</sub>) ging die Infektion bei 4 Kaninchen überhaupt nicht an, die beiden anderen entwickelten nur eine kleine Primärpocke. Die intrakutanen Infiltrate waren kleiner ( $3.000$  KID<sub>50</sub>: 0,8-1,5 cm;  $300$  KID<sub>50</sub> 0,4-1,0 cm) und von keinen Ödemen umgeben.

Die Einzelergebnisse aller ein- bzw. zweimal geimpften Tiere sind in Tabelle 9 zusammengefaßt.

Einen Überblick über die Pockenzahl/Skarifikationsfeld und den durchschnittlichen Infiltratdurchmesser bei ein- und zweimal geimpften Kaninchen nach kutaner und intrakutaner Belastungsinfektion mit 3.000 bzw. 300 KID<sub>50</sub> KuP-Virus "OPV 85" geben die Abbildungen 13 und 14.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die zweimal mit Vac-Virus "MVA" immunisierten Kaninchen wesentlich besser gegen eine Belastungsinfektion mit KuP-Virus "OPV 85" geschützt waren als die einfach geimpften Tiere.

| Gruppe                      | Tier<br>Nr. | Belastungsinfektion mit KuP-Virus "OPV 85" |               |                 |                 |                     | Bewer-<br>tung |
|-----------------------------|-------------|--------------------------------------------|---------------|-----------------|-----------------|---------------------|----------------|
|                             |             | kutan                                      |               | intrakutan      |                 |                     |                |
| Dosis/<br>KID <sub>50</sub> |             | 3.000                                      | 300           | 3.000           | 300             | Generali-<br>sation |                |
| 1                           | 181         | 10 PP<br>++ NP                             | 1 PP<br>10 NP | I 2,5<br>SÖ +++ | I 1,5<br>SÖ +++ | +++++++<br>Fieber   | nicht<br>immun |
|                             | 182         | 11 PP<br>3 NP                              | 2 PP<br>1 NP  | I 1,5<br>SÖ +++ | I 1,0<br>SÖ +++ | +++                 | teil-<br>immun |
| 2                           | 101         | 11 PP<br>3 NP                              | 1 PP<br>1 NP  | I 1,5<br>SÖ +++ | I 0,8<br>SÖ +++ |                     | immun          |
|                             | 190         | 5 PP<br>4 NP                               |               | I 1,5<br>SÖ ++  | I 0,8<br>SÖ ++  | ++                  | teil-<br>immun |

|   |     |              |      |       |       |  |       |
|---|-----|--------------|------|-------|-------|--|-------|
| 5 | 186 | 5 PP<br>1 NP |      | I 1,5 | I 1,0 |  | immun |
|   | 103 | 2 PP<br>2 NP | 1 PP | I 1,5 | I 1,0 |  | immun |
|   | 188 |              |      | I 0,8 | I 0,5 |  | immun |
| 6 | 194 | 2 PP<br>1 NP | 1 PP | I 1,2 | I 0,8 |  | immun |
|   | 195 |              |      | I 0,8 | I 0,4 |  | immun |
|   | 120 | 3 PP         |      | I 1,0 | I 0,5 |  | immun |

|   |     |                      |                 |                  |                 |                 |        |
|---|-----|----------------------|-----------------|------------------|-----------------|-----------------|--------|
| 7 | 189 | 30-40 PP<br>+++++ NP | 7 PP<br>+++ NP  | I 2,5<br>SÖ ++++ | I 2,0<br>SÖ +++ | +++++<br>Fieber | Kontr. |
|   | 000 | 20-30 PP<br>+++++ NP | 10 PP<br>+++ NP | I 2,5<br>SÖ ++++ | I 2,0<br>SÖ +++ | +++++<br>Fieber | Kontr. |

Tabelle 9 Reaktionen von Kaninchen, die einmal (Gruppe 1 und 2) bzw. zweimal (Gruppe 5 und 6) mit  $1,0 \times 10^7$  KID<sub>50</sub> Vac-Virus "MVA" subkutan bzw. intramuskulär geimpft wurden und ungeimpften Kaninchen (Gruppe 7) nach Belastungsinfektion mit 3.000 bzw. 300 KID<sub>50</sub> KuP-Virus "OPV 85"

PP=Primärpocken NP=Nebenpocken I=Infiltrat SÖ=Senkungsödem

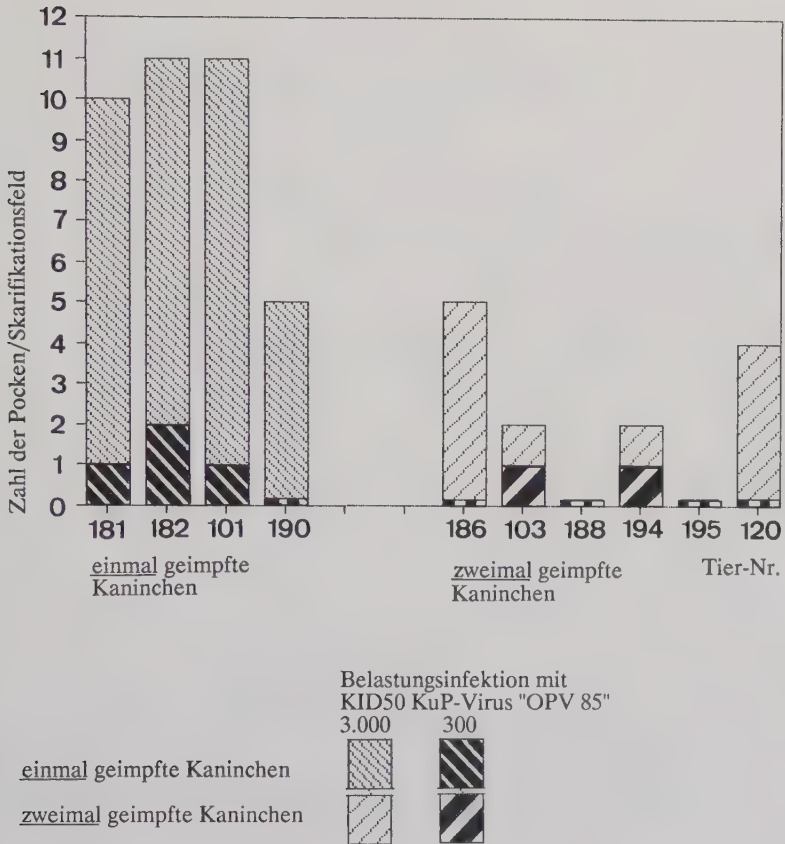
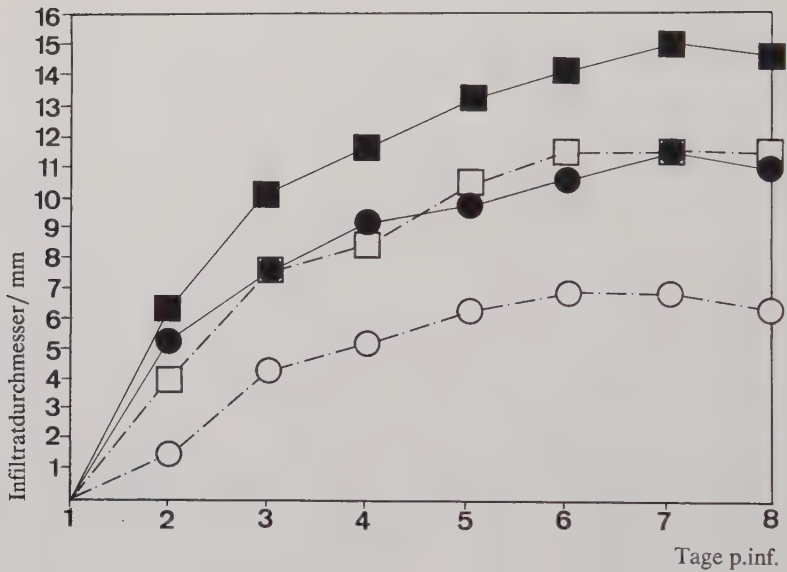


Abb. 13: Zahl der Pocken/Skarifikationsfeld nach kutaner Belastungsinfektion mit 300 und 3.000 KID<sub>50</sub> KuP-Virus "OPV 85" bei Kaninchen, die ein- (Gruppe 1 und 2) bzw. zweimal (Gruppe 5 und 6) mit Vac-Virus "MVA" geimpft wurden.



Belastungsinfektion  
mit KuP-Virus "OPV 85"  
3.000 300 KID<sub>50</sub>

einmal geimpfte Kaninchen —■— —□—

zweimal geimpfte Kaninchen —●— —○—

Abb. 14: Durchschnittlicher Infiltratdurchmesser nach intrakutaner Belastungsinfektion mit 300 und 3.000 KID<sub>50</sub> KuP-Virus "OPV 85" bei Kaninchen, die ein- (Gruppe 1 und 2) bzw. zweimal (Gruppe 5 und 6) mit Vac-Virus "MVA" geimpft wurden.

#### 4.1.3.5. Wirksamkeit der Applikationsart von Vac-Virus "MVA" gegenüber einer Belastungsinfektion mit KuP-Virus "OPV 85"

Dieser Versuch sollte beantworten, ob eine subkutane oder eine intramuskuläre Applikation von Vac-Virus "MVA" einen besseren Impfschutz gegenüber einer Belastungsinfektion mit KuP-Virus "OPV 85" vermittelt.

8 Kaninchen wurde der Impfstoff **subkutan** appliziert: 2 Tiere der Gruppe 1 impften wir einmal mit  $1,0 \times 10^7$  KID<sub>50</sub>, 3 Kaninchen der Gruppe 5 zweimal mit der gleichen Dosis und 3 Tiere aus Gruppe 3 zweimal mit  $0,5 \times 10^7$  KID<sub>50</sub>; 7 Kaninchen bekamen den Impfstoff **intramuskulär** verabreicht: 2 Kaninchen der Gruppe 2 wurden ein-, 3 Tiere der Gruppe 6 zweimal mit  $1,0 \times 10^7$  KID<sub>50</sub> immunisiert und 2 Kaninchen aus Gruppe 4 zweimal mit  $0,5 \times 10^7$  KID<sub>50</sub> vakzinisiert.

Bei den **subkutan** geimpften Kaninchen entwickelten sich auf den Skarifikationsfeldern mehr Pocken als bei den **intramuskulär** vakzinierten Tieren. Dies läßt sich vor allem auf dem Feld I ( $3.000$  KID<sub>50</sub>) nachweisen, wo im Durchschnitt pro Gruppe ungefähr doppelt soviel Primärpocken auftraten wie bei intramuskulär immunisierten Tieren. Ähnliche Verhältnisse waren auf dem Feld II ( $300$  KID<sub>50</sub>) zu beobachten.

Nach der intrakutanen Infektion mit  $3.000$  KID<sub>50</sub> KuP-Virus "OPV 85" fanden sich nur geringe Unterschiede zwischen beiden Applikationsarten, bei der geringeren Dosis von  $300$  KID<sub>50</sub> waren die Infiltratdurchmesser nach der subkutanen Gabe durchschnittlich ab dem 2. Tag um ca.  $0,5$  cm größer als bei intramuskulärer Verabreichung.

Bei fast allen zweimal intramuskulär immunisierten Tieren entstanden wenige Stunden p.inf. an den intrakutanen Injektionsstellen einmarkstückgroße, kugelige, weiche Ödeme, bei einzelnen Tieren waren zusätzlich beide Skarifikationsfelder gerötet und stark angeschwollen. Eine derart ausgeprägte Sofortreaktion wurde nur bei einem subkutan immunisierten Kaninchen (Nr. 186) beobachtet.

Die Einzelergebnisse der subkutan bzw. intramuskulär geimpften Kaninchen werden in Tabelle 10 im Überblick dargestellt. Die Abkürzungen sind in Tabelle 9 erklärt.

Einen Überblick über die Pockenzahl/Skarifikationsfeld und den durchschnittlichen Infiltratdurchmesser bei subkutaner bzw. intramuskulärer Applikation nach

kutaner und intrakutaner Belastungsinfektion mit 3.000 bzw. 300 KID<sub>50</sub> KuP-Virus "OPV 85" geben die Abbildungen 15 und 16.

Es ist demnach zusammenfassend zu konstatieren, daß Kaninchen, die Vac-Virus "MVA" subkutan verabreicht bekamen, weniger gut gegen eine Belastungsinfektion mit KuP-Virus "OPV 85" geschützt waren als intramuskulär vakzinierter Kaninchen.

| Gruppe                      | Tier<br>Nr. | Belastungsinfektion mit KuP-Virus "OPV 85" |               |                 |                 |                     | Bewer-<br>tung |
|-----------------------------|-------------|--------------------------------------------|---------------|-----------------|-----------------|---------------------|----------------|
|                             |             | kutan                                      |               | intrakutan      |                 |                     |                |
| Dosis/<br>KID <sub>50</sub> |             | 3.000                                      | 300           | 3.000           | 300             | Generali-<br>sation |                |
| 1                           | 181         | 10 PP<br>++ NP                             | 1 PP<br>10 NP | I 2,5<br>SÖ +++ | I 1,5<br>SÖ +++ | +++++++<br>Fieber   | nicht<br>immun |
|                             | 182         | 11 PP<br>3 NP                              | 2 PP<br>1 NP  | I 1,5<br>SÖ +++ | I 1,0<br>SÖ +++ | +++                 | teil-<br>immun |
| 3                           | 183         | 4 PP<br>1 NP                               | 1 PP          | I 1,5           | I 1,2           |                     | immun          |
|                             | 184         | 10 PP<br>4 NP                              | 1 PP<br>2 NP  | I 1,5<br>SÖ ++  | I 0,5<br>SÖ ++  |                     | immun          |
|                             | 187         | 4 PP<br>4 NP                               | 4 PP          | I 1,5<br>SÖ ++  | I 0,5           |                     | immun          |
| 5                           | 186         | 5 PP<br>1 NP                               |               | I 1,5           | I 1,0           |                     | immun          |
|                             | 103         | 2 PP<br>2 NP                               | 1 PP          | I 1,5           | I 1,0           |                     | immun          |
|                             | 188         |                                            |               | I 0,8           | I 0,5           |                     | immun          |
| 2                           | 101         | 11 PP<br>3 NP                              | 1 PP<br>1 NP  | I 1,5<br>SÖ +++ | I 0,8<br>SÖ +++ |                     | immun          |
|                             | 190         | 5 PP<br>4 NP                               | I 1,5         | I 0,8<br>SÖ ++  | ++<br>SÖ ++     |                     | teil-<br>immun |
| 4                           | 192         | 2 PP                                       | 1 PP          | I 1,3           | I 0,8           |                     | immun          |
|                             | 193         | 2 PP                                       |               | I 0,8<br>SÖ +   | I 0,2           |                     | immun          |
| 6                           | 194         | 2 PP<br>1 NP                               | 1 PP          | I 1,2           | I 0,8           |                     | immun          |
|                             | 195         |                                            |               | I 0,8           | I 0,4           |                     | immun          |
|                             | 120         | 3 PP                                       |               | I 1,0           | I 0,5           |                     | immun          |

Tabelle 10 Reaktionen von Kaninchen, die subkutan (Gruppe 1, 3 und 5) bzw. intramuskulär (Gruppe 2, 4 und 6) mit  $0,5 \times 10^7$  bzw.  $1,0 \times 10^7$  KID<sub>50</sub> Vac-Virus "MVA" ein- bzw. zweimal geimpft wurden, nach der Belastungsinfektion mit 3.000 bzw. 300 KID<sub>50</sub> KuP-Virus "OPV 85"

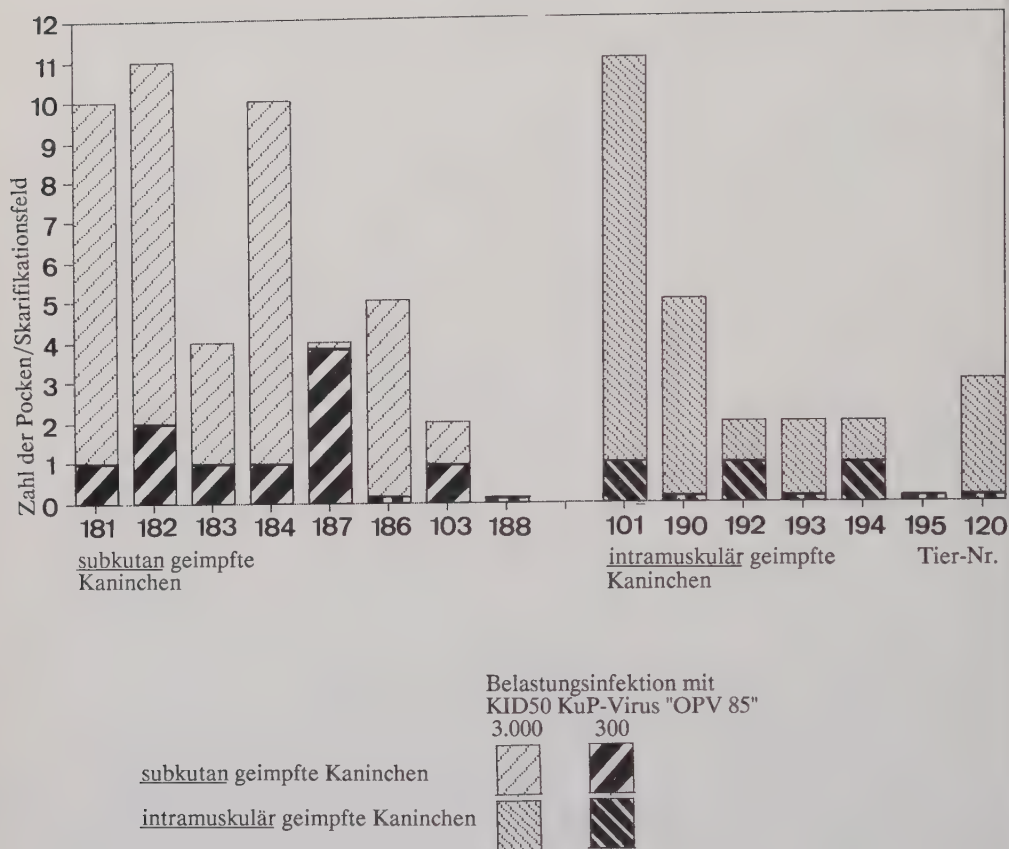
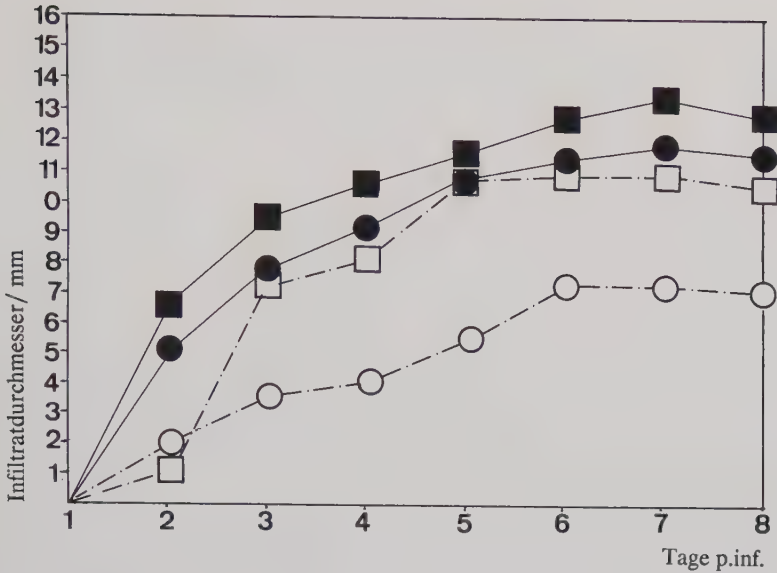


Abb. 15: Zahl der Pocken/Skarifikationsfeld nach kutaner Belastungsinfektion mit 300 und 3.000 KID<sub>50</sub> KuP-Virus "OPV 85" bei Kaninchen, die subkutan (Gruppe 1, 3 und 5) bzw. intramuskulär (Gruppe 2, 4 und 6) mit Vac-Virus "MVA" geimpft wurden.



Belastungsinfektion  
mit KuP-Virus "OPV 85"  
3.000 300 KID<sub>50</sub>

subkutan geimpfte Kaninchen —■— □—

intramuskulär geimpfte Kaninchen —●— ○—

Abb. 16: Durchschnittlicher Infiltratdurchmesser nach intrakutaner Belastungsinfektion mit 300 und 3.000 KID<sub>50</sub> KuP-Virus "OPV 85" bei Kaninchen, die subkutan (Gruppe 1, 3 und 5) bzw. intramuskulär (Gruppe 2, 4 und 6) mit Vac-Virus "MVA" geimpft wurden.

#### 4.1.3.6. Wirksamkeit der Impfdosis von Vac-Virus "MVA" gegenüber einer Belastungsinfektion mit KuP-Virus "OPV 85"

Mit diesem Versuch sollte geprüft werden, ob Kaninchen nach einer zweimaligen Immunisierung mit einer Dosis von  $0,5 \times 10^7$  KID<sub>50</sub> genauso gut gegen eine Belastungsinfektion mit KuP-Virus "OPV 85" geschützt waren wie nach einer Boosterimpfung mit der doppelten Dosis ( $1,0 \times 10^7$  KID<sub>50</sub>).

Fünf Kaninchen impften wir mit einer einfachen Dosis von  $0,5 \times 10^7$  KID<sub>50</sub>, 3 Tiere aus der Gruppe 3 bekamen sie subkutan, 2 aus der Gruppe 4 intramuskulär appliziert. Sechs Kaninchen verabreichten wir die doppelte Impfdosis ( $1,0 \times 10^7$  KID<sub>50</sub>), wobei wir 3 Tiere der Gruppe 5 wiederum subkutan, 3 Tiere der Gruppe 6 intramuskulär vakzinieren. Alle Tiere wurden zweimal im Abstand von 26 Tagen geimpft und 40 Tage nach der Erstvakzinierung mit KuP-Virus "OPV 85" belastet.

Nur bei den Kaninchen, die subkutan immunisiert waren, ließ sich nach dem kutanen Challenge eine geringgradige Beziehung zwischen der Impfdosis und dem klinischen Bild nachweisen. Die mit einfacher Dosis geimpften Tiere erkrankten auf beiden Feldern an ungefähr doppelt soviel Pocken wie die Kaninchen, die die doppelte Dosis bekamen. Die intramuskuläre Verabreichung führte dagegen bei beiden Infektionsdosen zu einer gleich guten Immunität.

Die Ursache hierfür dürfte der durch die intramuskuläre Applikation hervorgerufene stärkere immunogene Reiz sein, der den Dosisunterschied nicht mehr erkennen ließ.

Die Infiltrate glichen sich bei beiden Dosierungen weitgehend im Durchmesser, der geringgradige Unterschied von 2-3 mm lag innerhalb der Schwankungsbreite.

Die Einzelergebnisse der Kaninchen, die mit einer Dosis von  $0,5 \times 10^7$  KID<sub>50</sub> bzw.  $1,0 \times 10^7$  KID<sub>50</sub> Vac-Virus "MVA" geimpft worden waren, sind in Tabelle 11 zusammengefaßt.

Einen Überblick über die Pockenzahl/Skarifikationsfeld und den durchschnittlichen Infiltratdurchmesser bei einfacher bzw. doppelter Dosis nach kutaner und intrakutaner Belastungsinfektion mit 3.000 bzw. 300 KID<sub>50</sub> KuP-Virus "OPV 85" geben die Abbildungen 17 und 18.

Insgesamt war zu erkennen, daß Kaninchen, die zweimal mit  $1,0 \times 10^7$  KID<sub>50</sub> geimpft wurden, nur bei der subkutanen Verabreichung von Vac-Virus "MVA" einen geringgradig besseren Impfschutz gegen eine Belastungsinfektion mit KuP-Virus "OPV 85" aufwiesen als Kaninchen, denen zweimal  $0,5 \times 10^7$  KID<sub>50</sub> subkutan appliziert wurde.

| Gruppe | Tier Nr.                    | Belastungsinfektion mit KuP-Virus "OPV 85" |              |                |                | Generalisation | Bewertung |
|--------|-----------------------------|--------------------------------------------|--------------|----------------|----------------|----------------|-----------|
|        |                             | kutan                                      |              | intrakutan     |                |                |           |
|        | Dosis/<br>KID <sub>50</sub> | 3.000                                      | 300          | 3.000          | 300            |                |           |
| 3      | 183                         | 4 PP<br>1 NP                               | 1 PP         | I 1,5          | I 1,2          |                | immun     |
|        | 184                         | 10 PP<br>4 NP                              | 1 PP<br>2 NP | I 1,5<br>SÖ ++ | I 0,5<br>SÖ ++ |                | immun     |
|        | 187                         | 4 PP<br>4 NP                               | 4 PP         | I 1,5<br>SÖ ++ | I 0,5          |                | immun     |
| 4      | 192                         | 2 PP                                       | 1 PP         | I 1,3          | I 0,8          |                | immun     |
|        | 193                         | 2 PP                                       |              | I 0,8<br>SÖ +  | I 0,2          |                | immun     |

|   |     |              |      |       |       |  |       |
|---|-----|--------------|------|-------|-------|--|-------|
| 5 | 186 | 5 PP<br>1 NP |      | I 1,5 | I 1,0 |  | immun |
|   | 103 | 2 PP<br>2 NP | 1 PP | I 1,5 | I 1,0 |  | immun |
|   | 188 |              |      | I 0,8 | I 0,5 |  | immun |
| 6 | 194 | 2 PP<br>1 NP | 1 PP | I 1,2 | I 0,8 |  | immun |
|   | 195 |              |      | I 0,8 | I 0,4 |  | immun |
|   | 120 | 3 PP         |      | I 1,0 | I 0,5 |  | immun |

Tabelle 11 Reaktionen von Kaninchen, die mit  $0,5 \times 10^7$  (Gruppe 3 und 4) bzw.  $1,0 \times 10^7$  KID<sub>50</sub> Vac-Virus "MVA" (Gruppe 5 und 6) ein- bzw. zweimal subkutan bzw. intramuskulär geimpft wurden, nach der Belastungsinfektion mit 3.000 bzw. 300 KID<sub>50</sub> KuP-Virus "OPV 85"

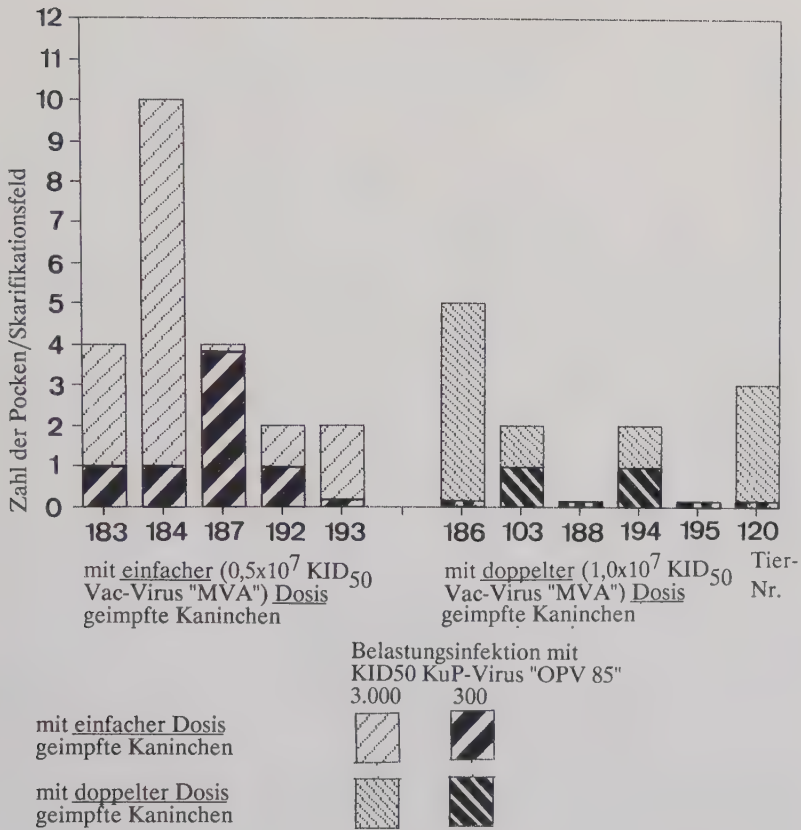
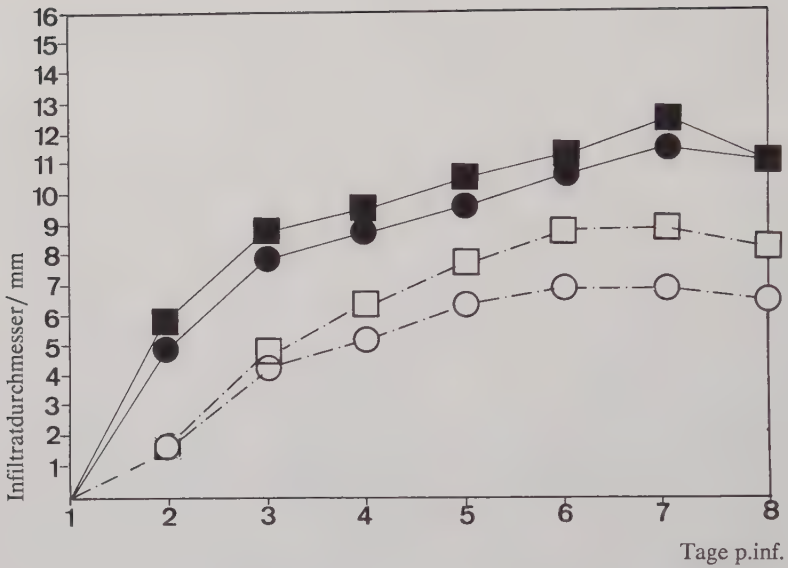


Abb. 17: Zahl der Pocken/Skarifikationsfeld nach kutaner Belastungsinfektion mit 300 und 3.000 KID<sub>50</sub> KuP-Virus "OPV 85" bei Kaninchen, die mit  $0,5 \times 10^7$  (Gruppe 3 und 4) bzw.  $1,0 \times 10^7$  (Gruppe 5 und 6) KID<sub>50</sub> Vac-Virus "MVA" geimpft wurden.



Belastungsinfektion  
mit KuP-Virus "OPV 85"  
3.000 300 KID<sub>50</sub>

mit einfacher ( $0.5 \times 10^7$  KID<sub>50</sub>)  
Dosis geimpfte Kaninchen

—■— —□—

mit doppelter ( $1.0 \times 10^7$  KID<sub>50</sub>)  
Dosis geimpfte Kaninchen

—●— —○—

Abb. 18: Durchschnittlicher Infiltratdurchmesser nach intrakutaner Belastungsinfektion mit 300 und 3.000 KID<sub>50</sub> KuP-Virus "OPV 85" bei Kaninchen, die mit  $0.5 \times 10^7$  (Gruppe 3 und 4) bzw.  $1.0 \times 10^7$  (Gruppe 5 und 6) KID<sub>50</sub> Vac-Virus "MVA" geimpft wurden.

#### 4.2. Antikörperbildung nach Immunisierung mit Vac-Virus "MVA" und nach Belastungsinfektion mit KuP-Virus "OPV 85"

##### 4.2.1. Standardisierung des ELISA

Als Antigen diente grob gereinigtes und beschalltes Vac-Virus "MVA" der 1. HEF-Passage, das nach 48 Stunden (gut ausgeprägter cpE) bzw. nach 72 Stunden (Zellrasen bereits weitgehend zerstört) geerntet worden war und gleich behandeltes HEF-Kontrollantigen.

Die geeignete Antigengebrauchsverdünnung zur Beschichtung der ELISA-Platten wurde mit Hilfe einer Schachbretttritation gegen negative und positive Referenzseren ermittelt. Virus- und Kontrollantigen wurden in unterschiedlichen Verdünnungsstufen auf verschiedene Platten aufgetragen und jede Verdünnungsstufe in einer Reihe mit einem Negativserum, schwach positiven und stark positivem Kontrollserum und PBS untersucht, wobei wir die Verdünnungen in 2er-Stufen titrierten. Für die spätere Beschichtung der Platten wurde diejenige Virusgebrauchsverdünnung ausgewählt, bei der im Schachbrettversuch bei niedrigen Verdünnungsstufen (1:10-20) maximale Extinktionsdifferenzen zwischen dem schwach positiven und negativen Kontrollserum sowie zwischen Virus- und Kontrollantigen auftrafen. Die Auswahl erfolgte mit einem schwach positiven Kontrollserum und bei niedrigen Verdünnungsstufen, weil bei den zu prüfenden Seren nach der ersten Immunisierung mit niedrigen Titerstufen zu rechnen war.

Zur Prüfung der Seren wurde nach 48 Stunden geerntetes Antigen verwendet, weil es bei diesen Untersuchungen höhere und konstantere Extinktionsdifferenzen als 78 Stunden lang vermehrtes Antigen aufwies, und 1:100 in Coating-Puffer verdünnt.

In weiteren Vorversuchen wurden die Mikrotiterplatten von folgenden Herstellern überprüft: Nunc, Falcon und Dynatech. Während die negativen und positiven Kontrollseren auf den Mikrotiterplatten von Nunc und Falcon sehr stark unspezifisch reagierten, zeigten die Platten von Dynatech deutliche Extinktionsunterschiede zwischen beiden Seren und zwischen den virus- und kontrollantigenbeschichteten Reihen.

Als Konjugat diente peroxidasekonjugiertes Anti-Kaninchen-Immunglobulin G von der Ziege, dessen geeignete Verdünnung (1:1500) mit Hilfe der Schachbretttritation gegen negatives und schwach positives Kontrollserum auf die gleiche Weise ermittelt worden war.

Um unspezifische Reaktionen weitgehend auszuschalten, wurde als Grenzwert zwischen positiven und negativen Seren das arithmetische Mittel der Extinktionswerte aller vor dem Versuchsbeginn gewonnenen Kaninchenserum zuzüglich der 2-fachen Standardabweichung (nach de Savigny und Voller, 1980) bei den Verdünnungsstufen 1:20 und 1:40 gewählt. Als positiv galten alle Verdünnungen, bei denen bei 1:20 der Extinktionswert größer als 0,2 und bei 1:40 größer als 0,1 war. Serumverdünnungen über 1:40 wurden am Grenzwert der Verdünnung 1:40 gemessen, als AK-Titer galt die Verdünnungsstufe, die einen Extinktionswert über

0,1 aufwies. Zusätzlich wurden mögliche unspezifische Reaktionen, die durch die Beschichtung der Platten mit nur sehr grob gereinigtem Antigen bedingt waren, dadurch berücksichtigt, daß der Extinktionswert jeder Serumverdünnung mit dem Virusantigen um das mindestens 1,5-fache über dem Wert mit Kontrollantigen lag (Kropp, 1985).

Zur Sicherung der Spezifität der nachgewiesenen Antikörper wurden in verschiedenen Untersuchungen eine Platte statt mit Antigen nur mit Coating-Puffer beschichtet (Nachweis einer unspezifischen Bindung von Serumbestandteilen an die Platte), Serumproben durch FKS (Nachweis einer unspezifischen Bindung von FKS) und das Konjugat durch seinen Verdünnungspuffer (Nachweis von substratumsetzenden Substanzen im Antigen und Serum) ersetzt. Bei sämtlichen Untersuchungen lagen die Extinktionswerte unter den Werten der negativen Kontrollen.

Zur Beurteilung der Reproduzierbarkeit des ELISA untersuchten wir die Seren je zweimal. Bei 80 % der Serumproben traten übereinstimmende Ergebnisse auf, bei einem Fünftel der Proben wich der Titer um eine Verdünnungsstufe ab, größere Schwankungen waren nicht zu bemerken.

#### 4.2.2. Antikörperbildung nach einer Immunisierung mit Vac-Virus "MVA" und nach einer Belastungsinfektion mit KuP-Virus "OPV 85"

Die humorale Immunantwort nach einer Impfung mit Vac-Virus "MVA" und nach einer Belastungsinfektion mit KuP-Virus "OPV 85" sollte durch der Nachweis von hämagglutinationshemmenden (HAH-), virusneutralisierenden (N-) und im ELISA festgestellten Antikörpern ("ELISA-AK") erbracht werden.

Die Testinfektion mit KuP-Virus "OPV 85" führte bei den zwei **nicht geimpften Kontrollen** zur Bildung von HAH-, N- und ELISA-AK mit hohen Titern. Der HAH-Titer betrug bei dem einen Tier 1:512, der N-Titer 1:1280 und der ELISA-Titer 1:20480. Beim anderen Kaninchen lag der Titer um je eine Stufe niedriger.

Nach der Erstimmunisierung war bei fast allen **geimpften** Kaninchen die Bildung von AK im N-Test und ELISA nachweisbar, nur die Tiere der Gruppe 3 wiesen keine AK auf. Durch die Revakzination stiegen bei allen Wiederimpfungen diese beiden AK-Titer kräftig an, während sie bei den ungeboosterten Kaninchen persistierten. Wenige Wiederimpfungen der Gruppe 5 und 6 wiesen niedrige HAH-AK-Titer auf. Die Belastungsinfektion regte bei allen geimpften Kaninchen die Antikörperbildung nochmals an, die N-AK stiegen um 2 bis 7 Titerstufen auf Absolutwerte zwischen 640 und 2560, die ELISA-AK um 1 bis 9 Stufen auf Werte zwischen 10240 und 40960; einige Kaninchen hatten somit höhere Absoluttitern als die Kontrollen. Da diese Tiere aber bereits vor der Infektion hohe AK-Titer besaßen, bildeten sie nur scheinbar mehr AK als die Kontrollen, in Wirklichkeit erhöhte sich ihr Titer nur um 3-4 Titerstufen. Erst nach der Infektion mit dem KuP-Virus "OPV 85" wiesen alle Kaninchen HAH-AK mit Titern zwischen 1:16 und 1:128 auf.

Ein geimpftes Kaninchen (Nr. 181) reagierte auf die Belastungsinfektion mit einer ähnlichen humoralen Immunantwort wie die Kontrollen. Dies bestätigten die klinischen Krankheitserscheinungen (vgl.4.1.2.).

Da die AK-Bildung sehr stark vom verwendeten Impfmodus beeinflusst wurde, werden alle anderen Ergebnisse der Kaninchen im Zusammenhang mit den einzelnen Impfparametern besprochen.

Die HAH-, N- und ELISA-Titer aller Kaninchen sind in den Tabellen 12 bis 14 zusammengefaßt.

| Gruppe | Tier-Nr. | Impfung<br>mit Vac-Virus "MVA" |                   | Belastungsinfektion<br>mit KuP-Virus "OPV 85" |
|--------|----------|--------------------------------|-------------------|-----------------------------------------------|
|        |          | 26. Tag<br>p.vac.              | 40. Tag<br>p.vac. | 54.Tag<br>p.vac.                              |
| 1      | 181      | 0                              | 0                 | 128                                           |
|        | 182      | 0                              | 0                 | 64                                            |
| 2      | 101      | 0                              | 0                 | 64                                            |
|        | 190      | 0                              | 0                 | 32                                            |
| 3      | 183      | 0                              | 4                 | 64                                            |
|        | 184      | 0                              | 0                 | 64                                            |
|        | 187      | 0                              | 0                 | 64                                            |
| 4      | 192      | 0                              | 0                 | 64                                            |
|        | 193      | 0                              | 0                 | 32                                            |
| 5      | 186      | 0                              | 0                 | 64                                            |
|        | 103      | 0                              | 4                 | 32                                            |
|        | 188      | 0                              | 0                 | 32                                            |
| 6      | 194      | 0                              | 0                 | 32                                            |
|        | 195      | 0                              | 4                 | 16                                            |
|        | 120      | 0                              | 4                 | 16                                            |
| 7      | 189      | -                              | -                 | 512                                           |
|        | 000      | -                              | -                 | 512                                           |

Tabelle 12 HAH-Titer nach Immunisierung mit Vac-Virus "MVA" und nach Belastungsinfektion mit KuP-Virus "OPV 85"

| Gruppe | Tier-Nr. | Impfung<br>mit Vac-Virus "MVA" |                   | Belastungsinfektion<br>mit KuP-Virus "OPV 85" |
|--------|----------|--------------------------------|-------------------|-----------------------------------------------|
|        |          | 26. Tag<br>p.vac.              | 40. Tag<br>p.vac. | 54. Tag<br>p.vac.                             |
| 1      | 181      | 5                              | 5                 | 2560                                          |
|        | 182      | 5                              | 10                | 1280                                          |
| 2      | 101      | 10                             | 20                | 2560                                          |
|        | 190      | 40                             | 40                | 2560                                          |
| 3      | 183      | 0                              | 80                | 640                                           |
|        | 184      | 0                              | 80                | 640                                           |
|        | 187      | 0                              | 160               | 640                                           |
| 4      | 192      | 20                             | 160               | 2560                                          |
|        | 193      | 10                             | 160               | 1280                                          |
| 5      | 186      | 5                              | 80                | 640                                           |
|        | 103      | 5                              | 160               | 640                                           |
|        | 188      | 20                             | 160               | 640                                           |
| 6      | 194      | 10                             | 160               | 640                                           |
|        | 195      | 20                             | 320               | 640                                           |
|        | 120      | 20                             | 320               | 640                                           |
| 7      | 189      | -                              | -                 | 1280                                          |
|        | 000      |                                |                   | 640                                           |

Tabelle 13 N-Titer nach Immunisierung mit Vac-Virus "MVA" und nach Belastungsinfektion mit KuP-Virus "OPV 85"

| Gruppe | Tier-Nr. | Impfung<br>mit Vac-Virus "MVA" |                   | Belastungsinfektion<br>mit KuP-Virus "OPV 85" |
|--------|----------|--------------------------------|-------------------|-----------------------------------------------|
|        |          | 26. Tag<br>p.vac.              | 40. Tag<br>p.vac. | 54.Tag<br>p.vac.                              |
| 1      | 181      | 20                             | 40                | 40560                                         |
|        | 182      | 20                             | 40                | 20480                                         |
| 2      | 101      | 40                             | 80                | 20480                                         |
|        | 190      | 160                            | 160               | 20480                                         |
| 3      | 183      | 0                              | 640               | 10240                                         |
|        | 184      | 0                              | 640               | 10240                                         |
|        | 187      | 0                              | 640               | 10240                                         |
| 4      | 192      | 80                             | 2560              | 10960                                         |
|        | 193      | 40                             | 2560              | 10240                                         |
| 5      | 186      | 20                             | 640               | 10240                                         |
|        | 103      | 20                             | 1280              | 10240                                         |
|        | 188      | 80                             | 5120              | 10240                                         |
| 6      | 194      | 40                             | 2560              | 10240                                         |
|        | 195      | 80                             | 5120              | 10240                                         |
|        | 120      | 80                             | 5120              | 10240                                         |
| 7      | 189      | -                              | -                 | 20480                                         |
|        | 000      | -                              | -                 | 10240                                         |

Tabelle 14 ELISA-Titer nach Immunisierung mit Vac-Virus "MVA" und nach Belastungsinfektion mit KuP-Virus "OPV 85"

#### 4.2.2.1. Zusammenhang zwischen der Zahl der Impfungen mit Vac-Virus "MVA" und der Antikörperbildung

Die **einmalige** Impfung mit Vac-Virus "MVA" führte bei allen Tieren der Gruppen 1, 2, 5 und 6 zur Bildung von schwachen N-AK-Titern zwischen 1:5 und 1:20 und niedrigen ELISA-Titern zwischen 1:20 und 1:80. Bei den einmal geimpften Tieren der Gruppe 1 und 2 persistierten die Titer in der folgenden Zeit oder erhöhten sich um nur eine Stufe. Die Belastungsinfektion regte die Antikörperbildung kräftig an, so daß die N-AK-Titer im Durchschnitt 7 Stufen, die ELISA-AK-Titer 7-9 Stufen anstiegen und die HAH-AK hohe Titer zwischen 1:64 und 1:128 erreichten. Die einmal geimpften Kaninchen reagierten auf die Belastungsinfektion nur mit einer geringgradig schwächeren Immunantwort als die Kontrollen.

Durch die Revakzination kam es bei den **zweimal** geimpften Kaninchen der Gruppe 4 und 6 zu einer so kräftigen Boosterung der AK, die die N-AK um 3-5, die ELISA-AK um 5-6 Titerstufen hob, daß beide AK-Titer nach der Belastungsinfektion nur noch um 1-2 Stufen stiegen und die HAH-AK meistens nur niedrige Werte zwischen 1:16 und 32 aufwiesen.

#### 4.1.2.2. Zusammenhang zwischen der Applikationsart von Vac-Virus "MVA" und der Antikörperbildung

Nach der Erstimmunisierung traten bei der **subkutanen** Verabreichung von Vac-Virus "MVA" meist sehr niedrige N-Titer von 1:5 und ELISA-Titer von 1:20 auf, alle Tiere der Gruppe 3 waren antikörpernegativ. Bei der **intramuskulären** Applikation wiesen alle Kaninchen Titer auf, die im Vergleich dazu um 2-3 Stufen höher lagen. Die unterschiedliche Antikörperbildung zeigte sich auch nach der Belastungsinfektion: sie rief bei subkutan geimpften Tieren einen 8-stufigen N-AK-An-

stieg und eine 3-4-stufige ELISA-AK-Erhöhung hervor und provozierte bei intramuskulär immunisierten Kaninchen eine 4-stufige Steigerung der N-Titer und eine 2-3-stufige Erhöhung der ELISA-Titer.

Nach der Revakzination waren diese Unterschiede in der AK-Antwort nicht mehr zu erkennen. Bei beiden Applikationsarten stiegen die N-AK in der Regel um den 5-6-stufigen, die ELISA-AK um den 3-4-stufigen Wert. Auch nach der auf die Wiederimpfung folgenden Challenge-Infektion zeigten sich kaum Unterschiede in der AK-Bildung zwischen der subkutanen und intramuskulären Verimpfung.

Nur nach der Erstimmunisierung kam es bei der intramuskulären Verabreichung von Vac-Virus "MVA" zu einer stärkeren Bildung von N- und ELISA-AK als bei der subkutanen Verimpfung. Diese unterschiedliche AK-Antwort war nach einer Wiederimpfung nicht mehr feststellbar.

#### 4.2.2.3. **Zusammenhang zwischen der Impfdosis von Vac-Virus "MVA" auf die Antikörperbildung**

Bei der Einfachimpfung bestand ein geringgradiger Zusammenhang zwischen AK-Bildung und Impfdosis, wenn Vac-Virus "MVA" subkutan verimpft wurde: bei keinem Kaninchen aus Gruppe 3, das eine Dosis von  $0,5 \times 10^7 \text{ KID}_{50}$  erhalten hatte, bildeten sich N- oder ELISA-AK. Im Gegensatz dazu wiesen Tiere, die die doppelte Dosis ( $1,0 \times 10^7 \text{ KID}_{50}$ ) bekommen hatten, niedrige N-Titer von 1:5 bis 1:20 und ELISA-Titer zwischen 1:20 und 1:40 auf. Nach der intramuskulären Erstimmunisierung reagierten die Kaninchen bei beiden Dosen gleich. Auch nach der Wiederimpfung und Challenge-Infektion waren Unterschiede in der AK-Antwort beider Dosierungen nicht mehr zu erkennen.

#### 4.2.2.4. Ergebnisse von HAH-Test, N-Test und ELISA im Vergleich

Bei allen Kaninchen lagen in der Regel die **ELISA**-Titer 2-4 Titerstufen über den **N**-Titern, jedoch konnten bei jedem Kaninchen, das **ELISA**-AK aufwies auch **N**-AK nachgewiesen werden. Kaninchen, die keine **ELISA**-AK hatten, waren auch im **N**-Test negativ, so daß der **ELISA** trotz höherer **AK**-Titer nicht spezifischer als der **N**-Test war.

Mit der **HAH** ließen sich nach der Erstimmunisierung mit **Vac-Virus "MVA"** bei keinem Kaninchen **AK** feststellen, nach der Wiederimpfung wiesen nur wenige Kaninchen **HAH**-**AK** mit schwachen Titern auf. Erst die Belastungsinfektion mit **KuP-Virus "MVA"** führte bei allen Kaninchen zur Bildung von **HAH**-**AK**, wobei ihre absolute Titerhöhe gut mit dem relativen Titeranstieg der **N**- und **ELISA**-**AK** korrelierte. So stiegen bei Kaninchen Nr. 181, das einen **HAH**-Titer von 1:128 aufwies die **N**- bzw. **ELISA**-**AK** um 9-10 Titerstufen, während bei Kaninchen Nr. 120 eine einstufige Titererhöhung von einem **HAH**-Titer von 1:128 begleitet war. Die **HAH**-**AK** eignen sich nicht zum **AK**-Nachweis bei einer Impfung mit **Vac-Virus "MVA"** sind aber ein gutes Maß für das Ansteigen der anderen **AK**-Arten und die Virusvermehrung nach einer Belastungsinfektion mit **KuP-Virus "OPV 85"**.

#### 4.2.2.4. Antikörperbildung und Wiederimpfreaktionen nach einer Belastungsinfektion mit KuP-Virus "OPV 85" im Vergleich

Bei allen Impfungen bestand ein Zusammenhang zwischen der Wiederimpfreaktion nach der kutanen und intrakutanen Belastungsinfektion mit **KuP-Virus "OPV 85"** und der Antikörperbildung nach einer Immunisierung mit **Vac-Virus "MVA"**. Kaninchen, die auf die Challenge-Infektion mit einer Schnellreaktion reagierten, wiesen vorher hohe Antikörpertiter auf, während die Kaninchen, bei denen die Belastungsinfektion als beschleunigte Reaktion oder Reaktion vom Erstimpftyp ablief, wenig **N**- und **ELISA**-**AK** ausgebildet hatten. Bei immunen Tieren war die zelluläre Abwehr und humorale Antikörperbildung gleichermaßen gut, bei fraglich oder nicht immunen Tieren waren beide Komponenten schlecht ausgebildet.

Sowohl die zelluläre als auch die humorale Immunität waren am Abwehrgeschehen beteiligt.

## 5. Besprechung der Ergebnisse

Die WHO erklärte im Mai 1980 offiziell die weltweite Ausrottung der Pocken des Menschen (Variola, Alastrim) und empfahl gleichzeitig, die seit etwa 180 Jahren praktizierte Pockenschutzimpfung aufzuheben. Ihre Wirksamkeit beruhte auf der sehr engen immunologischen Verwandtschaft des als Impfstoff verwendeten Vaccinia-Virus mit allen anderen Spezies des Genus Orthopoxvirus. Vac-Virus induzierte nicht nur eine Immunität gegen Variola und Alastrim, sondern auch einen Schutz gegen die anderen, - wenigstens theoretisch - vom Tier auf den Menschen übertragbaren Orthopockenviren: Vaccinia-, Affenpocken-, Kuhpocken-, Büffelpocken-, Kamelpocken-, Elefantpocken-, Pferd-pocken- und Kaninchenpockenviren.

Diese Tierpockenviren waren nach bisherigen epidemiologischen bzw. epizootiologischen Untersuchungen nicht ubiquitär im Tierstapel verbreitet. Sie kamen gelegentlich sporadisch, selten enzootisch vor und waren nur durch intensiven direkten oder indirekten Kontakt auf den Menschen übertragbar. In der Regel äußerten sie sich als nicht kontagiöse, gutartige Lokalerkrankungen, sehr selten traten sie bei besonders disponierten Personen und empfänglichen Kindern als schwere Allgemeinerkrankungen auf (Munz u. Mayr, 1984).

Seit der Einstellung der Pockenpflichtimpfung nimmt der Impfschutz (Individual- und Populationsschutz) in der Bevölkerung laufend ab, so daß nach der Unterschreitung eines bestimmten Schwellenwertes damit zu rechnen ist, daß 1. immer mehr Menschen für tierische Orthopocken-Viren empfänglicher werden, 2. die Erkrankungsfälle schwerer ablaufen und 3. eventuelle Infektionen leichter weitergegeben und durch Serienpassagen noch verstärkt werden könnten (Mayr u. Danner, 1979).

In neuester Zeit werden nun jedoch auch neben neuen, bisher nicht identifizierbaren Tierpockenviren bei einigen längst bekannten Pockenviren Änderungen in ihrer Wirtsspezifität beobachtet. Ein gutes Beispiel hierfür bietet das Kuhpockenvirus und dessen Varianten. Während in den Jahren bis 1960 Infektionen mit Kuhpockenvirus nur beim Rind (und selten auch beim Menschen) bekannt wurden, konnten in den letzten 25 Jahren bei zahlreichen weiteren Tierarten wie Raubkat-

zen, Ameisenbären, Okapis, Nashörnern, Nagetieren und Hauskatzen derartige Erkrankungen nachgewiesen werden. Gelegentlich erkrankten auch Menschen an einer Kuhpockenvirusinfektion, der Infektionsweg blieb dabei meist jedoch im Dunklen, wenn man auch Zusammenhänge mit Erkrankungen bei Nagern vermutete. In der BRD wurde erstmals 1985 ein solcher Fall bekannt. Es konnte ein Virus von einer ulzerativen, hämorrhagischen Läsion an der Hand eines Kindes isoliert werden, das nach zahlreichen Laboruntersuchungen mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit als Kuhpockenvirus gelten muß (Nasemann et al., 1987; Mahnel, 1986).

Diese zwar nur sehr seltenen, dafür aber immer wieder auftretenden Erkrankungsfälle beim Menschen zeigen, daß immer noch für einen bestimmten, wenn auch sehr kleinen Teil der Bevölkerung die Gefahr besteht, mit Orthopockenviren der Tiere infiziert zu werden und im Hinblick auf die schnell schwindende Grundimmunität der Bevölkerung gegen Orthopockenvirusinfektionen kann nicht geleugnet werden, daß in der Zukunft mit mehr Erkrankungsfällen zu rechnen ist. Deshalb kann nach wie vor eine Indikation zur Pockenschutzimpfung gegeben sein und zwar besonders bei Personen, die einen intensiven Kontakt mit Tieren haben. Dazu zählen in der Landwirtschaft arbeitende Personen, Tierärzte, das Personal von diagnostischen und Forschungslaboratorien, Epidemiologen, Zoopersonal, Zoologen, Tierhändler, Schlachthauspersonal, Forschungsreisende und andere (Mayr u. Danner, 1979).

Dabei wäre jedoch zu berücksichtigen, daß ein großer Teil der Impflinge bei einer Pockenimpfung heute als gefährdet zu gelten hätte, da sie als "überalterte Erstimpflinge" für postvakzinale Komplikationen besonders prädisponiert sind. Zudem darf nicht vergessen werden, daß immer mehr Personen immunsuppressiven Zuständen unterworfen sind (exogene und endogene Streßsituationen, Medikamentenabusus, immunsuppressive Therapie, Infektionen, innere Erkrankungen, Intoxikationen usw.) (Mayr et al., 1978).

Vor diesem Hintergrund sollten bei einer eventuell durchzuführenden (freiwilligen) Schutzimpfung gegen alle durch Orthopockenviren hervorgerufenen Erkrankungen nicht mehr die früher verwendeten virulenten Vaccinia-Virus-Stämme als Impfstoff verwendet werden, auch nicht der von der WHO empfohlene und in

Vorrat gehaltene Stamm Elstree. Alle diese ursprünglichen Vaccinia-Virus-Stämme können beim Impfling unvorhersehbare Komplikationen hervorrufen.

Als Mittel der Wahl für eine eventuelle Pockenschutzimpfung gelten heute schwach oder avirulente Vaccinia-Virus-Stämme, die ihre Virulenz durch starke Attenuierung weitgehend verloren haben, wie z.B. der **Vaccinia-Virus-Stamm "MVA"**. Mit ihm steht ein unschädlicher Impfstoff mit geringer Virulenz und fehlender Kontagiosität zur Verfügung, der parenteral verimpft werden kann (Mayr et al., 1975). Er war allerdings bisher beim Menschen nur zur Vorimpfung bei der aktiven Immunprophylaxe gegen eine Variola-Infektion zugelassen. In der Veterinärmedizin wurde er versuchsweise, doch erfolgreich gegen bestimmte Orthopoxvirus-Infektionen beim Tier verwendet.

So ist die **Wirksamkeitsprüfung** eines Impfstoffs Voraussetzung für die spätere Verwendung in praxi. Zahlreiche Untersuchungen belegen bereits die immunogene Wirksamkeit von Vac-Virus "MVA" gegenüber einer Infektion mit Vac-Virus "Elstree" (Hochstein-Mintzel et al., 1972, 1975; Blumenstein, 1976; Algasinger, 1980), das als homologes Impfvirus für Mensch und Tier pathogen ist und gegenüber einer Infektion mit dem heterologen Variola-Virus, das für den Menschen hochpathogen ist (Hochstein-Mintzel et al., 1972, 1975) und dem ausschließlich mäusepathogenen Ektromelie-Virus (Hochstein-Mintzel et al., 1972; Munz et al., 1973, 1974, 1979; Mayr et al. 1978)

Bei unseren Untersuchungen sollte die bisher noch nicht überprüfte Wirksamkeit von Vac-Virus "MVA" gegen eine Belastungsinfektion mit dem **Kuhpocken-Virus "OPV 85"** im Kaninchenmodell getestet werden. Der Stamm "OPV 85" wurde deshalb ausgewählt, weil er als ein heterologes, anscheinend natürlich verbreitetes, für Mensch und Tier pathogenes Pockenvirus stellvertretend für die in jüngster Zeit von zahlreichen Tierarten isolierten Kuhpockenvirusisolate gelten kann.

Bei Pocken sind neben Paramunitätsfaktoren sowohl zelluläre wie auch humorale Immunitätsfaktoren am Immungeschehen beteiligt, wobei den zellulären angeblich die größere Bedeutung zukommt. Für Nachweis der zellulären Immunität stehen uns nur indirekte Methoden zur Verfügung. So ist bei Impflingen eine bereits bestehende zelluläre Pockenimmunität nach einer erneuten Zweitinfektion mit Pockenviren an einer Überempfindlichkeit des Hautorgans gegenüber dem Virus zu

erkennen (delayed hypersensitivity), die sich als Spätreaktion vom Tuberkulintyp äußert (Herrlich, 1965). Dies war der Grund, warum wir für die Belastungsinfektion den kutanen und intrakutanen **Infektionsmodus** wählten.

Serologisch erfaßbare Immunitätsfaktoren sollten im HAH-Test, N-Test und im ELISA erfaßt werden, um daraus Rückschlüsse auf die Entwicklung der humoralen Immunität nach der Impfung und der Belastungsinfektion zu ziehen.

Das Ergebnis einer Belastungsinfektion mit Pockenviren wird sehr stark von der **Infektionsdosis** beeinflusst. Ist sie zu niedrig gewählt, erkranken nicht alle ungeimpften Kontrolltiere an einer typischen, eventuell zyklisch ablaufenden Pockenerkrankung. Bei geimpften Tieren, die nur schwächer reagieren, ist so keine Aussage möglich, ob die mildere Verlaufsform ohne Generalisierung eine Folge der bestehenden Immunität oder der zu niedrigen Belastungsdosis ist.

Andererseits kann eine zu hohe Challenge-Dosis jede Immunität durchbrechen (Mahnel, 1985). Dazu kommt, daß nach allgemeiner Erfahrung beim Tier Wiederimpfreaktionen nicht so deutlich zu diagnostizieren sind wie beim Menschen (Munz, persönliche Mitteilung).

In Vorversuchen wurde die geeignete Dosis für die kutane und intrakutane Infektion mit KuP-Virus "OPV 85" ermittelt. Bei beiden Infektionsarten wählten wir mit 3000 und 300 KID<sub>50</sub> die Dosis so aus, daß ein ungeimpftes Kontrollkaninchen an schweren generalisierten Kuhpocken mit hohem Fieber und multiplen Sekundärpocken auf der Haut erkrankte und bei einem geimpften Kaninchen die bestehende Immunität nicht durchbrochen wurde.

Die zur Belastungsinfektion im Hauptversuch verwendete Dosis darf bei der Bewertung der erzielten Immunität nicht unberücksichtigt bleiben. Sie wurde so hoch gewählt, daß alle Kontrolltiere an einer generalisiert verlaufenden Kuhpockeninfektion schwer erkrankten. Eine natürliche Infektion dürfte nur selten von einer derart hohen Infektionsdosis ausgelöst werden. Sicherlich wäre mit einer geringeren "OPV 85"-Dosis ein besserer Infektionsschutz nachzuweisen gewesen, aber auch die Auswertung des Versuchs wesentlich erschwert worden.

Im Hauptversuch war an Kaninchen die in vivo erkennbare und in vitro meßbare Wirksamkeit des Impfstoffes Vac-Virus "MVA" gegenüber einer Belastungsinfektion mit dem KuP-Virus "OPV 85" zu prüfen, wobei gleichzeitig die Beziehung zwischen Impferfolg und Impfmodus, beeinflusst durch

1. die Zahl der Impfungen (Einmal- und Doppelimmunisierung)
  2. die Applikationsart (subkutan und intramuskulär) und
  3. die Impfstoffdosis ( $0,5 \times 10^7$  bzw.  $1,0 \times 10^7$  KID<sub>50</sub> "MVA")
- untersucht werden sollte.

Durch die Immunisierung mit Vac-Virus "MVA" kam es bei keinem Tier zu Impfreaktionen. Die Impfung rief bei 12 von 15 Kaninchen eine belastbare Immunität gegenüber einer Belastungsinfektion mit KuP-Virus "OPV 85" hervor, drei Kaninchen waren nur teilweise oder gar nicht geschützt.

Die Impflinge mit einer belastbaren Immunität, die wir als immun bewerteten, reagierten auf die kutane und die intrakutane Belastungsinfektion mit einer typischen Wiederimpfreaktion in Form einer Schnellreaktion, was als Beweis einer guten zellulären Immunität gewertet wurde. Sie verlief beschleunigt gegenüber der Reaktion ungeimpfter Kontrollen: die Inkubationszeit war um einen bis zwei Tage verkürzt, der Höhepunkt der Reaktion 2 Tage früher erreicht und die Abheilung erfolgte wesentlich schneller. Das klinische Bild war deutlich abgeschwächt: bei der kutanen Infektion war die Zahl der gebildeten Primär- und Nebenpocken stark vermindert und die einzelne Primärpocke kleiner ausgebildet. Die intrakutanen Infiltrate waren wesentlich kleiner, ihre zentralen, hämorrhagischen Nekrosen weniger stark ausgeprägt und das umgebende Gewebe nicht so sehr entzündlich-ödematös verändert wie bei den Kontrolltieren. Bei den teilimmun Kaninchen kam es zusätzlich zu einer schwach verlaufenden Generalisation, während die nicht immun Impflinge genau wie die ungeimpften Kontrollen an schweren generalisierten Pocken mit hohem Fieber und zahlreichen Sekundärpocken auf der Haut erkrankten.

Für die Entwicklung einer Pockenimmunität ist neben der zellulären Abwehr die humorale Immunität von Bedeutung, dabei sind nach Herrlich und Mayr (1960) die N-AK die wichtigsten AK im Abwehrgeschehen. Sind sie vorhanden, ist ein Organismus in der Regel immun. Allerdings kann eine Immunität trotz fehlender AK bestehen (Herrlich et al., 1960).

In unserem Versuch wurden schon nach der Erstimmunisierung bei den meisten geimpften Kaninchen N-AK gebildet. Nach der Zweitimmunisierung waren die N-AK bei allen Tieren nachweisbar. Insgesamt wurde die Bildung der N-AK stark

vom verwendeten Impfmodus beeinflusst. Nach der Belastungsinfektion erreichten sie dann Titer zwischen 1:640-1280, die ähnlich hoch wie bei den ungeimpften Kontrollen lagen. Der Titer stieg kaum, wenn durch die Immunisierung bereits ein hoher AK-Spiegel vorhanden war.

Ähnlich wie die N-AK verhielten sich die **im ELISA nachweisbaren AK**. Ihre Titer lagen in der Regel 2-3 Stufen über denen der N-AK.

Im Gegensatz dazu konnten **HAH-AK** nach der ersten Impfung bei keinem Kaninchen, nach der Wiederimpfung nur bei wenigen Tieren nachgewiesen werden. Erst nach der Belastungsinfektion traten in unserem Versuch niedrige HAH-Titer zwischen 1:16 und 128 auf, die unter denen der Kontrolltiere (1:256 und 1:516) lagen. Dies war nicht weiter überraschend, da bei Vac-Virus "MVA" die Fähigkeit zur Hämagglutininbildung durch die Attenuierung in Zellpassagen reduziert ist (Mayr und Munz, 1964; Stickl et al., 1974).

Auch Hochstein-Mintzel et al. (1975), Blumenstein (1976) und Algasinger (1980) konnten nach einer einmaligen oder zweimaligen kutanen bzw. intramuskulären Applikation verschieden hoher Dosen von Vac-Virus "MVA" keine HAH-AK bei Kaninchen und Affen feststellen.

Während eine Beziehung zwischen HAH-Titer und dem Impfmodus nicht nachzuweisen war, bestand zwischen den HAH-Titern und dem klinischen Bild der kutanen bzw. intrakutanen Belastungsinfektion eine ebenso deutliche Abhängigkeit wie zum AK-Titer im N-Test und im ELISA: es wurden umso mehr HAH-AK gebildet, je schwerer die Belastungsinfektion mit KuP-Virus "OPV 85" verlief und je größer die Differenz der AK-Titer vor und nach der Belastungsinfektion war im N-Test und ELISA.

Damit werden Ergebnisse von Mahnel (1962) bestätigt, wonach die Bildung von HAH-AK in enger Beziehung zu einer Virusvermehrung im Organismus stand.

Bei allen Impfungen bestand ein Zusammenhang zwischen den klinischen Reaktionen auf die kutane und intrakutane Infektion mit KuP-Virus "OPV 85" und der Antikörperbildung. Kaninchen, die auf den Challenge mit einer typischen Wiederimpfreaktion (Schnellreaktion) reagierten, wiesen immer auch hohe N- und ELISA-AK-Spiegel auf, während bei Kaninchen mit niedrigen AK-Titern die Infektion als beschleunigte Reaktion und Reaktion vom Erstimpflingstyp verlief.

Die Wirksamkeit einer Immunisierung mit Vac-Virus "MVA" hing stark von der Zahl der Impfungen, der Applikationsart und der verwendeten Impfdosis ab, wobei folgende Zusammenhänge erkennbar waren:

Am stärksten wurde der Impferfolg von der **Zahl der Impfungen** beeinflusst. Er war nach einer Einmalimpfung wesentlich schlechter als nach einer Grund- und Wiederimmunisierung.

So waren 3 von 4 Kaninchen, die nur einmal subkutan oder intramuskulär mit einer Dosis von  $1,0 \times 10^7$  KID<sub>50</sub> vakziniert wurden, nur teilweise oder gar nicht gegen eine Infektion mit KuP-Virus "OPV 85" geschützt, was auch in fehlenden bzw. sehr niedrigen AK-Titern zum Ausdruck kam (N-AK 1:5 bis 1:20, Elisa-AK 1:20-1:80). Bei der Belastungsinfektion kam es zu einer starken Virusvermehrung, was zu hohen HAH-AK-Titer (bis 1:128) führte. Zwar bildeten sich auf den kutanen Skarifikationsfeldern weniger Pocken und bei der intrakutanen Infizierung kleinere Infiltrate als bei den ungeimpften Kontrollen, dafür erkrankten 2 Kaninchen an einer milden und ein Kaninchen an einer ebenso schweren Generalisation wie die Kontrollen, was einen starken Anstieg der N- und ELISA-AK um 7-9 Titerstufen zur Folge hatte.

Erst durch die Wiederimpfung wurde eine belastbare Immunität gegenüber der Infektion mit KuP-Virus "OPV 85" aufgebaut. Alle Kaninchen, die wir nach 26 Tagen mit der gleichen Dosis revakzinierten, waren immun. Dabei kam es zu einer kräftigen Boosterung der N- und ELISA-AK, die die N-Titer im Durchschnitt um 7-, die ELISA-Titer um 7-9 Stufen ansteigen ließ. Nach der Infektion mit KuP-Virus "OPV 85" verlief die Erkrankung abgeschwächt. Auf den Skarifikationsfeldern entwickelten sich im Schnitt nur halb so viel Pocken wie bei den einfach immunisierten Tieren, die intrakutanen Infiltrate waren kleiner. Bei keinem Kaninchen kam es zu einer Virusgeneralisation, so daß sich die N- und ELISA-AK nur um 1-2 Stufen erhöhten und die HAH-AK niedrige Werte (1:16-1:32) aufwiesen.

Auch nach Hochstein-Mintzel et al. (1975) führte erst die Wiederimpfung zu einer guten Immunität. 8 von 10 Kaninchen, die einmal intramuskulär mit Vac-Virus "MVA" verschiedener Dosis ( $10^4$ - $10^8$  PFU/ml) geimpft waren, erkrankten nach einer Belastungsinfektion mit Vac-Virus "Elstree" an konfluierenden Pocken auf der Haut und Schleimhaut, während 7 von 10 zweimal immunisierten Kaninchen symptomlos blieben und 3 Tiere vereinzelte Pocken aufwiesen. Auch bei Affen

führte erst die Wiederimpfung zu einem deutlichen Boostereffekt in der AK-Bildung. Gegenüber einer Belastungsinfektion mit Variola-Virus blieben 3 von 8 Affen symptomlos, die anderen erkrankten nur gering.

Nach Munz et al. (1974) stiegen bei Mäusen die HAH-Titer bei den verschiedensten Applikationsarten nach der Wiederholungsimpfung von Vac-Virus "MVA" um 2-3 Titerstufen.

Hoffmann (1979) verwendete Vac-Virus "MVA" bei Pockenwiederimpfungen, deren konventionelle Elstree-Erstimpfung entweder schon lange zurücklag oder mit Hilfe von Vaccinia-Antigen und Gammaglobulin-Schutz durchgeführt worden war. Nach der intrakutanen Verabreichung stiegen bei den meisten Wiederimpfungen die N-Titer um 1-2 Stufen.

Bei Algasinger (1980) kam es nach Wiederholungsimpfungen mit Vac-Virus "MVA" hingegen nur zu einer geringen Bildung von HAH-, N- und ELISA-AK.

Bei unseren Kaninchen wurde der Impferfolg auch von der **Applikationsart** des Impfstoffes beeinflusst.

Mit Vac-Virus "MVA" steht ein attenuierter Impfstoff zur Verfügung, der nach kutaner Applikation nicht ansteht. Für die Impfung gegen Tierpocken bei Mensch und Tier wird die subkutane Applikation von Vac-Virus "MVA" (Mayr, 1976) und die intramuskuläre Verabreichung (Mayr et al., 1978) empfohlen.

In unserem Versuch verglichen wir die subkutane und intramuskuläre Applikation nach ein- und zweimaliger Immunisierung von Vac-Virus "MVA" mit einer Dosis von  $0,5 \times 10^7$  und  $1,0 \times 10^7$  KID<sub>50</sub>. Mit der intramuskulären Applikation wurde eine bessere Immunität erzielt als bei der subkutanen Verabreichung.

Nach der Erstimmunisierung traten bei der subkutanen Verimpfung von  $1,0 \times 10^7$  KID<sub>50</sub> Vac-Virus "MVA" nur sehr niedrige N-Titer von 1:5 und ELISA-Titer von 1:20 auf, während bei einer Dosis von  $0,5 \times 10^7$  KID<sub>50</sub> keine AK gebildet wurden. Bei der intramuskulären Verabreichung wurden bei beiden Dosierungen N- und ELISA-AK gebildet, deren Titer 2-3 Stufen höher lagen. Nach der Belastungsinfektion war der Anstieg der N- und ELISA-Titer doppelt so hoch, wenn subkutan geimpft wurde.

Nach einer Wiederimpfung traten bei der Antikörperbildung keine Unterschiede mehr zwischen beiden Verabreichungsarten auf. Die Infektion mit KuP-Virus "OPV 85" hingegen verlief stärker, wenn Vac-Virus "MVA" subkutan gegeben

wurde. Auf den Skarifikationsfeldern entwickelten sich bei einer Belastungsdosis von 3.000 KID<sub>50</sub> KuP-Virus "OPV 85" mehr als doppelt soviel Pocken und bei 300 KID<sub>50</sub> mehr Pocken als bei den subkutan geimpften Tieren. Bei 300 KID<sub>50</sub> waren die Infiltratdurchmesser ab dem 2. Tag um ca. 5 mm größer.

Diese Befunde stimmen mit den Erfahrungen von Mayr et al. (1984) überein, daß bei Impfstoffen die Schutzwirkung der intramuskulären Applikation oft größer ist als die der subkutanen Verabreichung, besonders bei Erstimmunisierungen, während der Unterschied nach Wiederholungsimpfungen nicht mehr so ausgeprägt ist.

Schon Munz et al. (1974) stellten bei Mäusen einen deutlich besseren Infektionsschutz von i.m. appliziertem Vac-Virus "MVA" im Vergleich zur subkutanen Verabreichung fest.

Über die Ursachen für die bessere Schutzwirkung der intramuskulären Applikation gegenüber der subkutanen Verabreichung können nur Vermutungen angestellt werden. Entscheidend für den guten Immunisierungseffekt eines Impfstoffes ist wohl seine möglichst vollständige und schnelle Resorption von der örtlich begrenzten Injektionsstelle, wobei die ausreichende Durchblutung im Kapillargebiet des Applikationsortes von Einfluß ist. Besonders bei attenuierten Impfstoffen mit großem Virulenzverlust wie Vac-Virus "MVA" dürfte eine gute Resorption die entscheidende Voraussetzung für den Impferfolg sein. Da die kapilläre Durchblutung im Muskel im allgemeinen stärker ist als im subkutanen Gewebe, führt die intramuskuläre Applikation zu einer vollständigeren und rascheren Resorption.

Der Einfluß der **Impfdosis** auf den Impferfolg ist bei Vac-Virus "MVA" in zahlreichen Untersuchungen gezeigt worden (Hochstein-Mintzel et al. 1972, 1975; Munz et al., 1973, 1974, 1976; Algasinger, 1980). Durch den Virulenzverlust infolge der starken Attenuierung ist die Vermehrungsfähigkeit von Vac-Virus "MVA" im Impfling stark herabgesetzt, so daß einer ausreichenden Impfdosis eine ganz entscheidende Bedeutung zukommt.

In unserem Versuch wurden Kaninchen zweimal mit einer Dosis von je  $0,5 \times 10^7$  bzw.  $1,0 \times 10^7$  KID<sub>50</sub> Vac-Virus "MVA" immunisiert.

Wir konnten nur nach subkutaner Impfung einen schwachen Zusammenhang zwischen Impferfolg und -dosis nachweisen.

Nach der subkutanen Erstimpfung waren alle Tiere, die subkutan mit  $0,5 \times 10^7$  KID<sub>50</sub> geimpft wurden, antikörpernegativ, während die Tiere, die die doppelte Dosis ( $1,0 \times 10^7$  KID<sub>50</sub>) erhalten hatten, niedrige N-Titer zwischen 1:5 und 1:20 und ELISA-Titer zwischen 1:20 und 1:40 aufwiesen. Nach der Wiederimpfung und Challenge-Infektion bestanden keine Unterschiede mehr in der Antikörperantwort zwischen beiden Dosierungen.

Bei der kutanen Infektion war der Dosis einfluß noch schwach erkennbar. Die mit  $0,5 \times 10^7$  KID<sub>50</sub> geimpften Tier erkrankten sowohl bei 3.000 KID<sub>50</sub>, als auch bei 300 KID<sub>50</sub> KuP-Virus "OPV 85" an ungefähr doppelt soviel Pocken wie Kaninchen, die die doppelte Dosis bekamen.

Bei intramuskulärer Verabreichung bestanden weder in den AK-Tests noch im Belastungsversuch Unterschiede zwischen beiden Dosierungen.

Man könnte diesen Befund damit erklären, daß der Dosisunterschied zwischen  $0,5 \times 10^7$  und  $1,0 \times 10^7$  KID<sub>50</sub> zu klein war, um eine Beziehung zum Impferfolg nach der intramuskulären Applikationsart hervorzurufen, der bei der subkutanen Verabreichung, die einen etwas schwächeren Impfschutz vermittelt, ausreichte. Bei der intramuskulären Vakzination war diese Beziehung bereits durch die bessere immunogene Wirkung der intramuskulären Verabreichung aufgehoben.

Dieser geringe Dosisunterschied ist auch die Ursache für den scheinbaren Widerspruch unserer Versuchsergebnisse gegenüber den erwähnten anderen Untersuchungen, die bei Vac-Virus "MVA" eine größere Abhängigkeit zwischen Dosis und Impferfolg nachwiesen. Bei diesen Untersuchungen wurden in der Regel Virusdosen verwendet, deren Virusgehalt in 10-er Potenzen variiert wurde, während in unserem Versuch eine einfache Dosis mit einer doppelten Dosis verglichen wurde. Diese Dosisdifferenz war offensichtlich zu gering, um eine eindeutige Dosis-Wirkungsabhängigkeit zu bekommen.

Bei der Bewertung der Wirksamkeit des Impfstoffes Vac-Virus "MVA" ist die relativ geringe Zahl der getesteten Tiere in den einzelnen Gruppen zu berücksichtigen. Dies gilt vor allem für die Schlußfolgerungen über die Zusammenhänge von Impferfolg und angewendeter Impfmethode wie Zahl der Impfungen, Applikationsart und Impfdosis. Meist bestand jedoch ein eindeutiger Zusammenhang zwischen Impfmethode und Impfschutz, der am Ausgang der kutanen und intrakutanen Belastungsinfektion und an der Bildung von humoralen Antikörpern gemessen wurde. Unsere Versuchsanordnung ließ jedoch die prinzipielle Wirksamkeit von

Vac-Virus "MVA" gegenüber der Belastungsinfektion mit KuP-Virus "OPV 85" erkennen. Aus verständlichen Gründen unterblieben deshalb Versuche, die Ergebnisse durch eine höhere Tierzahl zu untermauern.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die Impfung mit Vac-Virus "MVA" gegen eine Infektion mit KuP-Virus "OPV" schützen kann. Die zweimalige Immunisierung führte dabei zu einer stärker belastbaren Immunität als die einmalige Impfung, auch erwies sich die intramuskuläre Applikation einer subkutanen Verabreichung überlegen.

Damit wurden erstmals experimentelle Grundlagen dafür geschaffen, Vac-Virus "MVA" als Impfstoff zur Prophylaxe gegen Infektionen mit Kuhpockenvirus bzw. mit kuhpockenvirusähnlichen Erregern bei Mensch und Tier prinzipiell zu empfehlen.

## 6. Zusammenfassung

Im Literaturteil der Arbeit wird ein Überblick über Kuhpocken- und Elefantenspockenvirusinfektionen gegeben, wobei besonders die Unterschiede zwischen originärem Kuhpockenvirus (*Orthopoxvirus bovis*), "kuhpockenähnlichem Virus" und Elefantenspockenvirus dargestellt sind. Dabei wird vor allem auf die Eigenschaften der Erreger und ihr Vorkommen sowie auf die Epizootiologie und das klinische Bild der Krankheit eingegangen.

Im experimentellen Teil der Arbeit prüften wir die Wirksamkeit einer Immunisierung mit Vaccinia (Vac)-Virus "MVA" gegen eine kutane und intrakutane Infektion mit dem Kuhpocken (KuP)-Virus "OPV 85" beim Kaninchen und untersuchten dabei die Zusammenhänge zwischen Impferfolg nach Primo- und Revakzination bei subkutaner oder intramuskulärer Applikation und verschiedenen Impfdosen.

Dazu wurden 15 Kaninchen, eingeteilt in 6 Gruppen, ein- bzw. zweimal im Abstand von 26 Tagen, subkutan bzw. intramuskulär mit einer Dosis von  $0,5 \times 10^7$  bzw.  $1,0 \times 10^7$  KID<sub>50</sub> Vac-Virus "MVA" immunisiert. 40 Tage nach der Erstimmunisierung unterzogen wir alle geimpften und zwei ungeimpfte Kontrollkaninchen einer kutanen und intrakutanen Belastungsinfektion mit 300 und 3.000 KID<sub>50</sub> KuP-Virus "OPV 85".

Eine zelluläre Immunität äußerte sich nach der kutanen bzw. intrakutanen Infektion mit KuP-Virus "OPV 85" als typische Wiederimpfreaktion mit beschleunigtem Verlauf und abgeschwächten Krankheitserscheinungen. Serumantikörper konnten im Hämagglutinationshemmungstest, Neutralisationstest und im Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) nachgewiesen werden.

Aus den Versuchen lassen sich folgende Schlußfolgerungen ziehen:

1. Bei allen Kaninchen wurden nach der Immunisierung mit Vac-Virus "MVA" und nach der Infektion mit KuP-Virus "OPV 85" neutralisierende und im ELISA nachweisbare Antikörper gebildet. Hämagglutinationshemmende Antikörper konnten nach der Impfung i.d.R. nicht festgestellt werden, nach der "OPV 85"-Infektion waren sie jedoch ein guter Indikator für die Virusvermehrung im Organismus.

2. Alle geimpften Kaninchen mit Ausnahme eines Tieres waren gegenüber einer Belastungsinfektion mit KuP-Virus "OPV 85" teilweise bzw. völlig geschützt. Die geimpften Kaninchen reagierten mit einer typischen Wiederimpfreaktion mit beschleunigtem Verlauf und verminderten Krankheitserscheinungen: nach kutaner Infektion mit KuP-Virus "OPV 85" war die Zahl der Pocken pro Skarifikationsfeld, nach intrakutaner Infektion der Infiltratdurchmesser vermindert. Nie kam es zu einer generalisierten Pockenerkrankung.

3. Antikörperbildung und klinisches Bild der Wiederimpfreaktion waren von der Zahl der Impfungen, der Applikationsart und der Impfdosis abhängig.

4. Nach einmaliger Impfung mit Vaccinia-Virus "MVA" waren 3 von 4 Kaninchen teil- bzw. nicht immun. Mit einer zweimaligen Immunisierung wiesen alle Kaninchen eine gute Immunität gegenüber einer Infektion mit KuP-Virus "OPV 85" auf.

5. Eine intramuskuläre Impfstoffapplikation vermittelte einen besseren Impfschutz als die subkutane Verabreichung.

6. Mit einer Impfdosis von  $0,5 \times 10^7$  KID<sub>50</sub> wird eine geringgradig schlechtere belastbare Immunität aufgebaut als mit einer Dosis von  $1,0 \times 10^7$  KID<sub>50</sub> Vac-Virus "MVA".

7. Kaninchen, bei denen die Infektion mit KuP-Virus "OPV 85" stark beschleunigt und abgeschwächt verlief, wiesen immer hohe N- und ELISA-Antikörpertiter nach der Impfung auf.

8. Im ELISA lagen die Antikörpertiter stets um 2-4 Titerstufen höher als im Neutralisationstest.

9. Vac-Virus "MVA" kann als Impfstoff zur Prophylaxe gegen Infektionen mit Kuhpocken-Virus bzw. mit "kuhpockevirusähnlichen" Erregern bei Mensch und Tier prinzipiell empfohlen werden.

## Summary

**Linckh, S.**      **The efficacy of immunization with vaccinia-virus strain "MVA" against infection with cowpoxvirus strain "OPV 85". Experimental investigations in rabbits and a review on cowpoxvirus infections of man and animals.**

A review is given on cowpoxvirus, elephantpoxvirus and cowpoxlike viruses.

The immunological efficacy of vacciniavirus "MVA" was tested against a dermal and intradermal infection with cowpoxvirus "OPV 85" in rabbits. The correlation between immunity and subcutaneous or intramuscular primo- bzw. revaccination and different vaccine doses has been investigated.

15 rabbits were once or twice vaccinated subcutaneously or intramuscularly in an interval of 26 days with  $0,5 \times 10^7$  and  $1,0 \times 10^7$  CID<sub>50</sub> vacciniavirus "MVA" and challenged by a dermal and intradermal infection with 300 and 3.000 CID<sub>50</sub> cowpoxvirus "OPV 85".

In comparison to non-vaccinated control animals the provocation of a delayed hypersensitivity reaction and the phenomenon of a "revaccination reaction" indicated a cellular immunity; antibodies, detected by HAI-, N-tests and ELISA proved the presence of a humoral immunity.

The following conclusions can be made:

1. After immunisation with vacciniavirus "MVA" and after infection with cowpoxvirus all rabbits developed N- and ELISA-antibodies. HAI-antibodies were not found after immunization, but indicated a multiplication of cowpoxvirus after challenge.
2. All vaccinated rabbits were partly or absolutely immun against an infection with cowpoxvirus "OPV 85". The vaccinated rabbits showed a so called "revaccination reaction" characterized by a faster and milder development of clinical symptoms.
3. Formation of antibodies and clinical symptoms were related to the modus, application and doses of vaccination.
4. A single vaccination with vacciniavirus "MVA" provided only insufficient immunity, a second immunization induced good immunity.
5. Intramuscular immunization protected better than a subcutaneous application of vacciniavirus "MVA".
6. The immunogenic efficacy of  $1,0 \times 10^7$  CID<sub>50</sub> was insignificantly better than of  $0,5 \times 10^7$  CID<sub>50</sub> vacciniavirus "MVA".
7. Rabbits with a faster development of challenge reactions and less serious symptoms had high N- and ELISA-antibodies.
8. Antibodies detected by Elisa were 2 to 4 times (log 10) higher than N-antibodies.
9. Vacciniavirus "MVA" is suggested for immunization of man and animal against possible infections with cowpoxvirus and cowpoxlike viruses.

## 7. Literaturverzeichnis

ALGASINGER, M., 1980

Verlauf der Antikörperbildung nach Erst- und Wiederimpfung mit dem attenuierten Vaccinia-Virus Stamm MVA

Vet. Med. Diss., München

AMANO, H. U I. TAGAYA, 1981

Isolation of cowpox virus clones in production of type A inclusions: relationship to the production of diffusible LS antigen

J. gen. Virol. 54, 203-207

ARCHARD, L.C., M. MACKETT, D.E. BARNES, K.R. DUMBELL, 1979

Restriction endonuclease analysis of red cowpox virus and its white pock variant

J. gen. Virol. 45, 51-63

ARCHARD, L.C., M. MACKETT, D.E. BARNES, K.R. DUMBELL, 1984

The genome structure of cowpox virus white pock variants

J. gen. Virol. 65, 875-886

ARITA, M., I. TAGAYA, 1980

Virion polypeptides of poxviruses

Arch. Virol. 63, 209-225

BASSE, A., E.A. FREUNDT, J. FALMER HANSEN, 1964

Ein Ausbruch von Pockenkrankheit bei Okapis im Kopenhagener Zoo

Verh. Ber. Erkr. Zootiere 6, 55-62

BAXBY, D., 1969

Variability in the pocks produced on the chorioallantois by white pock mutants of cowpox and other poxviruses

J. Hyg., Camb. 67, 637-647

BAXBY, D., 1972

A comparison of the antigens present on the surface of virus released artificially from chick cells infected with vaccinia virus, and cowpox virus and its white pock mutant

J. Hyg., Camb. 70, 353-365

BAXBY, D., 1975 a

Identification and interrelationships of the variola/ vaccinia subgroup of poxviruses

Prog. med. Virol. 19, 215-146

BAXBY, D., 1975 b

Laboratory characteristics of British and Dutch strains of cowpox virus

Zbl. Vet. Med. B, 22, 480-487

- BAXBY, D., 1977 a  
Is cowpox misnamed? A review of 10 human cases.  
Brit. Med. J. 1, 1379-1381
- BAXBY, D., 1977 b  
Poxvirus hosts and reservoirs  
Arch. Virol. 55, 169-179
- BAXBY, D., 1977 c  
Possible antigenic sub-divisions within the Variola/vaccinia subgroup of poxviruses  
Arch. Virol. 54, 143-145
- BAXBY, D., 1979  
Antibody studies in natural bovine cowpox  
J. Hyg., Camb. 83, 425-428
- BAXBY, D., 1982  
The surface antigens of orthopoxviruses detected by cross-neutralisation tests on cross-absorbed antisera  
J. gen. Virol. 58, 251-262
- BAXBY, D., B. GHABOOSI, 1977  
Laboratory characteristics of poxviruses isolated from captive elephants in Germany  
J. gen. Virol. 37, 407-414
- BAXBY, D., C.J.M. RONDLE, 1968  
The inhibition of growth of vaccinia and cowpox viruses in RK 13 cells  
J. Hyg., Camb. 66, 191
- BAXBY D., D.G. ASHTON, D. JONES, L.R. THOMSETT, E.M. DENHAM, 1979 a  
Cowpox virus infection in unusual hosts  
Vet. Rec. 24, 175
- BAXBY, D., W.B. SHAKLETON, J. WHEELER, A. TURNER, 1979 b  
Comparison of cowpox-like viruses isolated from European zoos  
Arch. Virol. 61, 337-340
- BAXBY, D., D.C. ASHTON, D.M. JONES, L.R. THOMSETT, 1982  
An outbreak of cowpox in captive cheetahs: virological and epidemiological studies  
J Hyg., Camb. 89, 365-372
- BAXBY, D., M. BENNETT, R.M. GASKELL, 1985  
Medical implications of feline cowpox  
Lancet ii, 45
- BEDSON, H.S., 1982  
Enzyme studies for the characterization of some orthopoxvirus isolates  
Bull. WHO 60, 377-380

BEDSON H.S., K.R. DUMBELL, 1961

The effect of temperature on the growth of pox viruses in the chick embryo  
J. Hyg., Camb. 59, 457-469

BEDSON, H.S., K.R. DUMBELL, W.R.S. THOMAS, 1963

Variola in Tanganyika  
Lancet ii, 1085-1088

BENNETT, M., D. BAXBY, R.M. GASKELL, C.J. GASKELL, D.F. KELLY, 1985

The laboratory diagnosis of orthopoxvirus infection in the domestic cat  
J. small Anim. Pract. 26, 653-661

BENNETT, M., C.J. GASKELL, R.M. GASKELL, D. BAXBY, T.J. GRUFFYDD-JONES, 1986

Poxvirus infection in the domestic cat: some clinical and epidemiological observations  
Vet. Rec. 118, 387-390

BERGER, K., 1956

Kuhpocken und Vaccinevirus  
Zeitschr. f. Hygiene 143, 151-158

BERGER, K., F. PUNTIGAM, 1958

Experimentelle Kuhpockeninfektion beim Rind  
Zbl. Bakt. Hyg., I.Abt., Orig. B 172, 363-369

BLUMENSTEIN, M., 1976

Der Einfluß einer Erstimmunisierung mit dem attenuierten Vaccinia Virus Stamm MVA auf den Verlauf hämagglutinations-hemmender und virusneutralisierender Antikörper nach Zweitimmunisierung mit Vaccinia Virus Stamm Elstree  
Vet. Med. Diss., München

DATHE, H., 1966

Über einen weiteren Fall von Haut- und Schleimhauterkrankungen bei Elefanten  
Ver.Ber. Erkr. Zootiere, 157, 173

DATHE, H., 1967

Über weitere Fälle von Elefantenpocken  
Zool. Garten N.F. 33, 194-204

DAVIES, J.H.T., L.R. JANES, A.W. DOWNIE, 1938

Cowpox infection in farmworkers  
Lancet ii, 1534-1538

DEKKING, F., 1964

Cowpox and vaccinia  
in:

J. van der Hoeden: Zoonoses, 411-418

Elsevier Publishing Company, Amsterdam 1964

DOSCH, F., H. MORITSCH, 1956

Virologische Untersuchungen im Zusammenhang mit einer Laboratoriumsinfektion durch Kuhpockenvirus

Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt., Orig. B 166, 517-528

DOWNIE, A.W., 1939 a

A study of the lesions produced experimentally by cowpox virus

J. Path. Bact. 48, 361-379

DOWNIE, A.W., 1939 b

The immunological relationship of the virus of spontaneous cowpox to vaccinia virus

Brit. J. exp. Path. 20, 158-176

DOWNIE, A.W., D.W. HADDOCK, 1952

A variant of cowpox virus

Lancet i, 1049-1050

DOWNIE, A.W., K. MC CARTHY, 1950

The viruses of variola, vaccinia, cowpox and ectromelia. - neutralization tests on the chorioallantois with unabsorbed and absorbed immune sera

Brit. J. exp. Path. 31, 789-796

DOWNIE, A.W., A. MACDONALD, 1950

A study of the pox viruses by complement fixation and inhibition of complement-fixation methods

J. Path. Bact. 62, 389-401

EGBERINK, H.F., A. WILLEMSE, M.C. HORZINEK, 1986

Isolation and identification of a poxvirus from a domestic cat and a human contact case

J. Vet. Med. B, 33, 237-240

FENNER, F., 1958

The biological characteristics of several strains of vaccinia, cowpox and rabbitpox viruses

Viol. 5, 502-529

FENNER, F., 1979

Portraits of viruses: the poxviruses

Intervirol. 11, 137-157

FENNER, F., F.M. BURNET, 1957

A short description of the poxvirus group (vaccinia and related viruses)

Viol. 4, 305-314

GASKELL, R.M., C.J. GASKELL, R.J. EVANS, P.E. DENNIS, A.M. BENNETT, N.D. UDALL, C. VOYLE, T.J. HILL, 1983

Natural and experimental pox virus infection in the domestic cat

Vet. Rec. 114, 164-170

GEHRING, H., H. MAHNEL, H. MAYER, 1972

Elefantenpocken

Zbl. Vet. Med. B, 19, 258-261

GEHRING H., H. MAYER, 1978

Beitrag zur Diagnostik und Bekämpfung der Pockeninfektion bei Elefanten

Prakt. Tierarzt 2, 106-107

GIBBS, E.P.J., R.H. JOHNSON, D.F. COLLINGS, 1973

Cowpox in a dairy herd in the United kingdom

Vet. Rec. 92, 56-64

GISPEN, R., 1955

Analysis of pox-virus antigens by means of double diffusion

J. Immunolog. 74, 134-141

GROTH, A., 1921

Über Wertbestimmung der Schutzpockenlymphe

Zschr. Hyg. Infekt.-Kr. 92, 129-157

HAMMER, H, 1939

Über Hautleiden und äußere Leiden des Elefanten

Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 39, 210-211

HARPER, L., BEDSON, HS. BEDSON, A. BUCHAN, 1979

Identification of orthopox viruses by polyacrylamide gel electrophoresis of intracellular polypeptides

Virol. 93, 433-444

HASS, H.-D., 1963

Über die Beteiligung des menschlichen Auges bei der in Leipzig aufgetretenen "Bösartigen Haut- und Schleimhauterkrankung der Elefanten"

Zool. Garten 27, 104-106

HERRLICH, A., 1965

Handbuch der Schutzimpfungen

Springer Verlag, Berlin

HERRLICH, A., 1967

Die Pocken

Georg Thieme Verlag, Stuttgart

HERRLICH, A., A. MAYR, 1954

Vergleichende experimentelle Arbeiten über die "Vaccine-Kuhpocken-Viren"

Arch. Hyg. 138, 479-504

HERRLICH, A., A. MAYR, 1955

Die Differenzierung der Tierpocken im bebrüteten Hühnerei

Arch. Hyg. 139, 444-466

HERRLICH, A., A. MAYR, H. MAHNEL, E. MUNZ, 1963

Experimental studies on transformation of the variola into the vaccinia virus

Arch. Virusforsch. 12, 579-586

HERZBERG, K., 1935

Über die Herstellung von Gewebekulturlymphnen und ihre Brauchbarkeit in öffentlichen Impfterminen  
Z. Immun. Forsch. 86, 417-441

HOARE, C.M., 1984

Cowpox in cats  
Vet. Rec. 114, 22

HOCHSTEIN-MINTZEL, V., H. CH. HUBER, H. STICKL, 1972

Virulenz und Immunogenität eines modifizierten Vaccinia-Virus (Stamm MVA)  
Z. Immun.-Forsch. 144, 140-156

HOCHSTEIN- MINTZEL, V., T. HÄNICHEN, H. HUBER, H. STICKL, 1975

Vaccinia- und variolaprotektive Wirkung des modifizierten Vaccinia- Stammes MVA bei intramuskulärer Immunisierung  
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Org. A 320, 283-297

HOFFMANN, F., 1979

Vakzinia-Antikörper-Boosterung durch MVA-Impfstoff beim Pockenwiederimpf-  
ling  
Münch. med. Wschr. 121, 913-914

ICHIHASI, Y., S. MATSUMOTO, 1968

The relationship between poxvirus and A-type inclusion body during double infection  
Virol. 36, 262-270

ISCHIHASHI, Y., S. MATSUMOTO, S. DALES, 1971

Biogenesis of poxviruses: role of A-type inclusions and host cell membranes in virus dissemination  
Virol. 46, 507-532

ISCHIHASHI, Y., S. DALES, 1973

Biogenesis of poxviruses: relationship between a translation complex and formation of A-type inclusions  
Virol. 51, 297-319

IKUTA, K., H. MIYAMOTO, S. KATO, 1979a

Comparative Studies on LS antigens induced by vaccinia and cowpox viruses  
J. gen. Virol. 45, 755-759

IKUTA, K., H. MIYAMOTO, S. KATO, 1979 b

Serologically cross-reactive polypeptides in vaccinia, cowpox and Shope fibroma viruses  
J. gen. Virol. 44, 557-563

JENNER, E. 1798

An inquiry into the cases and effects of the variolae vaccinae, a disease discovered in some of the western countries of England particularly Gloucestershire, and known by the name of the cowpox.  
London, Sampson Low

JOKLIK, W.K., 1962

The purification of four strains of poxvirus  
*Viol.* 18, 9-18

JOKLIK, W.K., 1966

The poxviruses  
*Bact. Rev.* 30, 33-66

KAERBER, G., 1931

Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche  
*Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* 162, 480-483

KATO, S., M. TAKHASHI, S. KAMEYAMA, J. KAMAHORA, 1959

A study on the morphological and cyto-immunological relationship between the inclusions of variola, cowpox, rabbitpox, vaccinia (variola origin) and vaccinia IHD and a consideration of the term "Guarnieri body"  
*Biken J.* 2, 353-363

KATO, S., J. HARA, M. OGAWA, H. MIYAMOTO, J. KAMAHORA, 1963

Inclusion markers of cowpox virus and alastrim virus  
*Biken J.* 6, 233-235

KERN, R., 1987

Versuche zur serologischen Charakterisierung von Orthopoxvirus mit Hilfe monoklonaler Antikörper  
*Vet. Med. Diss., München*

KITAMOTO, N., E. GOTO, S. TANIMOTO, T. TANAKA, H. MIYAMOTO, N. WAKAMIYA, K. IKUTA, S. UEDA, S. KATO, 1984

Cross-reactivity between cowpox and vaccinia viruses with monoclonal antibodies  
*Arch. Virol.* 82, 129-136

KITAMOTO, N., S. TANIMOTO, K. HIROI, T. TANAKA, H. MIYAMOTO, N. WAKAMIYA, K. IKUTA, S. UEDA, S. KATO, 1986 a

Polypeptide analysis with monoclonal antibodies of A-type inclusion bodies induced by cowpox virus  
*Arch. Virol.* 89, 15-28

KITAMOTO, N., S. TANIMOTO, K. HIROI, T. TANAKA, H. MIYAMOTO, N. WAKAMIYA, K. IKUTA, S. UEDA, S. KATO, 1986 b

Cross-reactivity among cowpox, ectromelia and vaccinia viruses with monoclonal antibodies recognizing distinct antigenic determinants in A-type inclusion bodies  
*Arch. Virol.* 91, 357-366

KITAMOTO, N., S. TANIMOTO, K. HIROI, M. OZAKI, H. MIYAMOTO, N. WAKAMIYA, K. IKUTA, S. UEDA, S. KATO, 1987

Monoclonal antibodies to cowpox virus: polypeptide analysis of several major antigens  
*J. gen. Virol.* 68, 239-246

KRAUSS, H., A. WEBER, 1986

Zoonosen  
 Deutscher Ärzte-Verlag, Köln

KRETZSCHMAR, CH., H. KÖTHER, 1972

Verlauf und Ätiologie von Elefantenspockenkrankungen im Magdeburger Zoologischen Garten

Verh. Ber. Erkr. Zootiere 14, 197-210

KRIKUN, V.A., 1974

Isolation of pneumotropic virus from white rats during outbreak of a disease of unknown etiology in an animal farm

Abstr. of papers from the Conference "Laboratornye Zhivotnye v meditsinskikh Issledovaniyakh, Academy of Medical Sciences; Moscow pp. 165-167 (russ.)

KROPP, E.-M., 1985

Kamelpocken- eine synoptische Darstellung, sowie der Nachweis von Antikörpern in ostafrikanischen Dromedarseren mit einem ELISA

Vet. Med. Diss., München

KUBIN, G., O. KÖLBL, F. GERSTL, 1975

Charakterisierung eines vom Elefanten isolierten Pockenvirusstammes

Wien. tierärztl. Mschr. 62, 271-276

KUNTZE, A., 1974

Zur Klinik der Pocken bei Asiatischen Elefanten (*Elephas maximus*). 1. Mitt.: Pockeneinbruch und -verlauf in einer elfköpfigen Elefantenherde

Verh. Ber. Erkr. Zootiere 16, 281-289

KUNTZE, A., M. BÜRGER, S. JANCKE, I. TÖPFER, 1975

Exungulation aller Extremitäten bei einer Elefantin im Gefolge einer Pockeninfektion

Mh. Vet.-Med. 30, 703-707

KUNTZE, A., 1982

Weitere Erfahrungen zur Klinik und Therapie der Pockenkrankung beim Elefanten (*Elephas Maximus*)

Mh. Vet.-Med. 37, 460-462

KUNTZE, A., V. JANETZKY, 1982

Zur Ätiologie, Serologie und Immunprophylaxe der Pocken des asiatischen Elefanten (*Elephas maximus*)

Mh. Vet.-Med. 37, 496-499

KUNTZE, A., U. NIEMER, 1974

Zur Klinik der Pocken bei Asiatischen Elefanten

2. Mitt.: Serologie und Epidemiologie

Verh. Ber. Erkr. Zootiere 26, 291-296

LADNYI, J.D., Z.J. ORORODNIKOVA, E.M. SHELUKHINA, R.T. GERASIMENOKO, Y.S. VORONIN, 1975

Poxvirus circulation among wild rodents in turkmenia

Problemy osobo opasnykh Infektsii Nr. 3-4, 43-44 (russ.)

LAEMMLI, U.K., 1970

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T

4

Nature 227, 680-685

- LEDINGHAM, J.C.G., 1935  
Comparative study of clinically allied viruses: some unsolved problems of Edward Jenner  
Proc. Roy. Soc. Med. 29, 73-82
- MACKETT, M., L.C. ARCHARD, 1979  
Conservation and variation in orthopoxvirus genome structure  
J. gen. Virol. 45, 683-701
- MAHNEL, H., 1974  
Labordifferenzierung der Orthopockenviren  
Zbl. Vet. Med. B, 21, 242-258
- MAHNEL, H., 1985  
Trinkwasserimpfung gegen Mäusepocken (Ektromelie)  
Zbl. Vet. Med. B, 32, 479-487
- MAHNEL, H., 1986  
Identifizierung eines Kuhpockenvirus, isoliert von einem Kind  
J. Vet. Med. B, 33, 362-370
- MAHNEL, H., 1987  
Experimentelle Ergebnisse über die Stabilität von Pockenviren unter Labor- und Umweltbedingungen  
J. Vet. Med. B, 34, 449-464
- MAHNEL, H., E. MUNZ, 1987  
Zur derzeitigen epizootiologischen Lage bei den Tierpocken  
Tierärztl. Umschau 42, 5-14
- MAIBORODA, A.D., 1982  
Experimental infection of norwegian rats (*Rattus Norvegicus*) with ratpox virus  
Acta virol. 26, 288-291
- MAIBORODA, A.D., Z.I. LOBANOVA, V.A. DUSHKIN, 1980  
Pathogenicity of ratpox virus for laboratory mice  
Z. Versuchstierk. 22, 25-31
- MALECKI, G, E. ZUCHOWSKA, 1980  
Pox-like disease in *Elephas maximus*  
Medyoyna Weterynaryjna 36, 667-669
- MALTSEVA, N.N., S.S. MARRENNIKOVA, 1976  
A method for serological differentiation of closely related poxviruses  
Acta virol. 20, 250-252
- MALTSEVA, N.N., S.S. MARENNIKOVA, G.R. MATSEVICH, L.G. STEPANOVA, N.A. HABAHPASHEVA, 1985  
Standardization of ELISA for Detection of antibodies to Orthopoxviruses  
Acta virol. 29, 294-298

MARENNIKOVA, S.S., 1979

Field and experimental studies of poxvirus infections in rodents  
Bull. WHO 57, 461-464

MARENNIKOVA S.S., N.N. MALTSEVA, V.I. KORNEEVA, V.M. GARANINA, 1975

Pox infection in Carnivora of the family Felidae  
Acta virol. 19, 260

MARENNIKOVA, S.S., N.N. MALTSEVA, V.I. KORNEEVA, 1976 a

Pox in giant ant-eaters due to agent similar to cow-pox virus.  
Br. vet. J. 132, 182-186

MARENNIKOVA, S.S., E.M. SHELUKHINA, 1976 b

White rats as source of pox infection in Carnivora of the family Felidae  
Acta virol. 20, 442

MARENNIKOVA, S.S., N.N. MALTSEVA, V.I. KORNEEVA, N.M. GARANINA, 1977

Outbreak of pox disease among Carnivora (Felidae) and Edentata  
J. infect. Dis. 135, 358-366

MARENNIKOVA, S.S., E.M. SHELUKHINA, V.A. FIMINA, 1978 a

Pox infection in white rats  
Lab. Anim. 12, 33-36

MARENNIKOVA, S.S., I.D. LANDNYJ, Z.I. OGORODNIKOVA, E.M. SHELUKHINA, N.N. MALTSEVA, 1978 b

Identifikation and study of a poxvirus isolated from wild rodents in Turkmenia  
Arch. Virol. 56, 7-14

MARENNIKOVA, S.S., N.N. MALTSEVA, N.A. HABAHPASEVA, 1981

ELISA - a simple test for detecting and differentiating antibodies to closely related orthopoxviruses  
Bull.WHO. 59, 365- 369

MARENNIKOVA, S.S., E.M. SHELUKHINA, E.V. EFREMOVA, 1984

New outlook on the biologie of cowpox virus  
Acta virol. 28, 437-444

MARTIN, W.B., F.M.M. SCOTT, I.M. LAUDER, A. NASH, 1984

Poxvirus infection of cats  
Vet. Rec. 115, 36

MARTLAND, M.F., S. FOWLER, G.J. POULTON, D. BAXBY, 1983

Pox virus infection of a domestic cat  
Vet. Rec. 112, 171-172

MARTLAND, M.F., G.J. POULTON, R.A. DONE, 1985

Three cases of cowpox infection of domestic cats  
Vet. Rec. 117, 231-233

MATTHEWS, R.E.F., 1982

Classification and nomenclature of viruses. Fourth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses

Intervirol. 17, 1-200

MAYER, H, 1973

Eine generalisierte Vaccinia-Pockeninfektion eines Zirkuselefanten als Ursache menschlicher Erkrankungen

Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 224, 448-452

MAYER, H., H. GEHRING, H. MAHNEL, 1972

Elefantenpocken in einem Wanderzirkus

Verh. Ber. Erkr. Zootiere 14, 211-216

MAYR, A., 1956

Experimentelle Arbeiten über das hämagglutinierende Prinzip bei den Tierpockenviren

Arch. ges. Virusforsch. 6, 439-471

MAYR, A., 1966

Eine einfache und schnelle Methode zur Differenzierung zwischen Vaccine-(poxvirus officinale) und Kuhpockenvirus (poxvirus bovis)

Zbl. Bakt. Hyg., I. Orig. B 199, 144-151

MAYR, A., 1976

TC-Marker des attenuierten Vaccinia-Impfstammes "MVA" in menschlichen Zellkulturen

Zbl. Vet. Med. B, 23, 417-430

MAYR, A., 1984

Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre

F. Enke Verlag, Stuttgart

MAYR, A., 1985

Zur Gefährdung des Menschen durch Tierpocken nach Aufhebung der Pflichtimpfung gegen Pocken

Hautarzt 36, 493-495

MAYR, A., K. DANNER, 1979

Bedeutung von Tierpocken für den Menschen nach Aufhebung der Pflichtimpfung gegen Pocken

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 92, 251-256

MAYR, A., E. MUNZ, 1964

Veränderung von Vaccinevirus durch Dauerpassagen in Hühnerembryofibroblastenkulturen

Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B 195, 24-35

MAYR, A., P.A. BACHMANN, B. BIBRACK, G. WITTMANN, 1974

Virologische Arbeitsmethoden I

VEB Gustav Fischer Verlag, Jena

MAYR, A., H. MAHNEL, E. MUNZ, 1972  
Systematisierung und Differenzierung der Pockenviren  
Zbl. Vet. Med. B, 19, 69-88

MAYR, A., V. HOCHSTEIN-MINTZEL, H. STICKL, 1975  
Abstammung, Eigenschaften und Verwendung des attenuierten Vaccinia-Stammes MVA  
Infect. 3, 6-14

MAYR, A., P.A. BACHMANN, B. BIBRACK, G. WITTMANN, 1977  
Virologische Arbeitsmethoden II  
VEB Gustav Fischer Verlag, Jena

MAYR, A., H. STICKL, H.K. MÜLLER, K. DANNER, H. SINGER, 1978  
Der Pockenimpfstamm MVA: Marker, genetische Struktur, Erfahrungen mit der parenteralen Schutzimpfung und Verhalten im abwehrgeschwächten Organismus  
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B 167, 375-390

MAYR, A., G. EIBNER, B. MAYR-BIBRACK, 1984  
Handbuch der Schutzimpfungen in der Tiermedizin  
Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg

MIMS, C.A., 1968  
Intracerebral injections and the growth of viruses in the mouse brain  
Brit. J. Exp. Path. 41, 52-59

MORITSCH, H., 1956  
Experimentelle Untersuchungen über die Vermehrung des Vaccina- und des Kuhpockenvirus in der Maus  
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B 166, 427-453

MORITSCH, H., 1957 a  
Experimentelle Untersuchungen über Anreicherungsversuche des Kuhpockenvirus im Gehirn der Maus  
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B 168, 165-173

MORITSCH, H., 1957 B  
Virulenz und Pathogenität des Kuhpockenvirus  
Z. Tropenmed. 8, 333-348

MOSCOVICI, C., E.P. COHEN, J. SANDERS, 1963  
Isolation of a viral agent from pseudocowpox disease  
Science 141, 915-916

MULLER, H.K., R. WITTEK, W.SCHAFFNER, D. SCHUEMPERLI, A. MENNA, R. WYLER, 1978  
Comparison of five poxvirus genomes by analysis with restriction endonucleases Hin d III, Bam I and Eco RI  
J. gen. Virol. 38, 135-147

MUNZ, E., A. MAYR, 1984

Problem der Tierpocken nach der Aufhebung der Pflichtimpfung gegen die Menschenpocken

Tierärztl.Umschau 39, 187-196

MUNZ, E., M. REIMANN, R. HOFFMANN, E. GÖBEL, 1974

Perorale Immunisierungsversuche mit Vaccinia-Virus gegen Mäusepocken

Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B 159, 10-30

MUNZ, E., M. REIMANN, W.-D. TSCHKEKEL, 1976

Die Aerosol-Impfung gegen Mäusepocken (Infektiöse Ektromelie) im Vergleich zu anderen Vakzinationsverfahren unter Verwendung von Vaccinia- und Mäusepockenvirus-haltigen Impfstoffen

Zbl. Vet.-Med. B, 23, 431-440

MUNZ, E., M. REIMANN, R. KAUFMANN, 1979

Die Belastbarkeit einer maternalen Immunität von Saugmäusen gegen Mäusepocken- neue Möglichkeiten einer Immunprophylaxe mit Orthopockenviren

Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B 169, 495-509

NAKANO, J.H., 1977

Comparative diagnosis of poxvirus diseases

in:

E. KURSTAK, CH.KURSTAK

Comparative diagnosis of viral diseases Vol. I, 288-339

Academic Press, New York

NASEMANN, TH., A. MAYR, G. SCHAEIG, W. KIMMIG, H. MAHNEL, 1987

Infektion eines Mädchens mit Kuhpockenvirus

Hautarzt, 38, 414-418

OSBORN, J.G., P.M. CHESTERS, J.D. WILLIAMSON, 1984

Arginine metabolism in infected cell cultures as a marker character for the differentiation of orthopoxviruses

J. Hyg., Camb. 93, 213-233

PARKER, R.F., T.M. RIVERS, 1936

Immunological and chemical investigations of vaccine virus response of rabbits to inactive elementary bodies of vaccinia and to virus-free extracts of vaccine virus

J. Exer. Med. 63, 69-94

PAYNE, L.G., 1986

The existence of an envelope on extracellular cowpox virus and its antigenic relationship to the vaccinia envelope

Arch. Virol. 90, 125-133

PILASKI, J., K. SCHALLER, B. MATERN, G. KLÖPPEL, H. MAYER, 1982

Pockenerkrankungen bei Elefanten und Nashörnern

Verh. Ber. Erkr. Zootiere 24, 257-265

PILASKI, J., B. BÖSCH, H.-H. MARSHALL, H.-R.FREY, B. LIESS, H. MAYER, 1983

Ein Beitrag zu weiteren Pockenausbrüchen bei Elefanten (*Elephas maximus*) in Europa mit methodischen Hinweisen für die Diagnostik  
Verh. Ber. Erkr. Zootiere 25, 249-254

PILASKI, J., J.W. FOSTER, B. MATERN, G. KLÖPPEL, K. SCHALLER, 1984  
Weitere Beiträge zur Epidemiologie der kuhpockenähnlichen Erkrankungen der Zootiere

Verh. Ber. Erkr. Zootiere 26, 349-354

PILASKI, J., E. MAGUNA, C. HAGENBECK, 1985

Pocken bei asiatischen Elefanten (*Elephas maximus*) im Tierpark Carl Hagenbeck, Hamburg

Verh. Ber. Erkr. Zootiere 27, 437-445

PILASKI, J., A. RÖSEN, G. DARAI, 1986

Comparative analysis of the genomes of orthopoxviruses isolated from elephant, rhinoceros, and okapi by restriction enzymes

Arch. Virol. 88, 135-142

PLOWRIGHT, W., R.D. FERRIS, 1959

Papular stomatitis of cattle. Reproduction of the disease with culture-passaged virus

Vet. Rec. 71, 828

POTEL, K., 1967 a

Kuhpocken, Variola Vaccina

in:

H. RÖHRER

Handbuch der Virusinfektionen bei Tieren, Band II, 425-442

VEB Gustav Fischer Verlag, Jena 1967

POTEL, K., 1967 b

Pockenähnliche Erkrankung bei Elefanten

in:

H. RÖHRER

Handbuch der Virusinfektionen bei Tieren, Band II, 481-484

VEB Gustav Fischer Verlag, Jena 1967

POTEL, K., A. VOIGT, T. HIEPE, H. KRONBERGER, G. HEIDER, K. ELZE, L. DITTRICH, 1963

Eine bösartige Haut- und Schleimhauterkrankung bei Elefanten

Zool. Garten N.F. 27, 1-103

PUNTIGAM, F., K. BERGER, 1958

Über das Verhalten des weißen Blutbildes, der Serumeiweißkörper und des Serumcholesterins bei experimenteller Kuhpockeninfektion von Jungrindern

Zeitschr. f. Hygiene 145, 199-208

RÖSEN, A., J. PILASKI, G. DARAI, 1987

Genomic characterization of a poxvirus isolated from a child

Med. Microbiol. Immunol. 176, 181-188

RONdle, C.J.M., K.R. DUMBELL, 1962

Antigens of cowpox virus  
J. Hyg., Camb. 60, 41-49

SCHALLER, K., J. PILASKI, 1979

Pocken bei Breitmaulnashörnern (*Ceratotherium s. simum*) im Zoologischen Garten Münster

Zool. Garten N.F., Jena 49, 169-184

SCHÖNBAUER, M., A. SCHÖNBAUER-LÄNGLE, S. KÖLBL, 1982

Pockeninfektion bei einer Hauskatze

Zbl. Vet. Med. B, 29, 434-440

SPRÖßIG, M., R. MACHMERTH, R. MIKSCH, 1968

Isolierung eines Virus der Pockengruppe bei einem erkrankten Elefanten

Intern. Symp. über Fragen des Pockenschutzes, Leipzig, J.A. Barth-Verlag, 1968, 271-279

THOMSETT, L.R., D. BAXBY, E.M.H. DENHAM, 1978

Cowpox in the domestic cat

Vet. Rec. 103, 567

TONGEREN, H.A.E. VAN, 1952

Spontaneous mutation of a cowpox virus by means of egg passage

Arch. ges. Virusforsch. 5, 35-52

TRIPATHY, T.N., L.E. HANSON, R.A. CRANDELL, 1981

Poxviruses of veterinary importance: diagnosis of infections  
aus:

E. Kurstak

Comparative diagnosis of Viral Diseases, Volume III

Academic Press, 1981

TURNER, A., D. BAXBY, 1980

Structural polypeptides of orthopoxvirus: their distribution in various members and location within the virion

J. gen. Virol. 45, 537-545

WEBSTER, J., J.R. JEFFERIES, 1984

Cowpox in cats

Vet. Rec. 114, 151

WILLEMSE, A., H.F. EGBERINK, 1985

Transmission of cowpox virus infection from domestic cat to man

Lancet, i, 1515

WITTEK, R., 1982

Organization and expression of the poxvirus genome

Experientia 38, 285-297

ZWART, P., R. GIPSEN, J.C. PETERS, 1971

Cowpox in okapis (*Okapia johnstoni*) at Rotterdam Zoo

Br. vet. J. 127, 20-24

Für die Überlassung eines Arbeitsplatzes bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. R. Gothe.

Sehr herzlich danke ich Herrn Prof. Dr. E. Munz für die Überlassung des Themas, die wissenschaftliche Anleitung und für seine jederzeit gern gewährte, freundliche Hilfe und Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. H. Mahnel bedanke ich mich für seine hilfreichen Ratschläge zur Durchführung der Versuche.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. W. Pfahler, der mich mit viel Geduld in die virologischen Arbeitsmethoden einführte und mir jederzeit seinen Rat und seine tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung meiner Versuche gewährte.

Bei Herrn M. Reimann bedanke ich mich recht herzlich für seine wertvollen Hinweise und seine bereitwillige Hilfe bei der Durchführung der Versuche und für die freundliche Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.



## LEBENS LAUF

Name: Susanne Linckh

geboren am: 31.05.1960  
in: München

Eltern: Dr. med. Harald Linckh, Arzt  
Lotte Linckh, geb. Trinklein, Hausfrau

Schule: Tegelbergschule Geislingen,  
Dez. 1966 - Juli 1970  
Michelberggymnasium Geislingen,  
Aug. 1970 - Juni 1979  
Abitur am 13.06.1979

Studium: Studium der Veterinärmedizin  
  
Freie Universität Berlin,  
April 1980 - Feb. 1981  
Ludwig-Maximilians-Universität München,  
Mai 1981 - Feb. 1986  
Tierärztliche Prüfung am 13.02.1986

Dissertation: seit Okt.1986 am Institut für Vergleichende  
Tropenmedizin und Parasitologie der Ludwig-  
Maximilians-Universität München





